

PROTOPLASMA

IN VERBINDUNG MIT R. CHAMBERS UND W. SEIFRIZ
BEGRÜNDET VON FRIEDL WEBER UND JOSEF SPEK

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

J. BRACHET	N. KAMIYA	H. KINZEL	A. PISCHINGER	S. STRUGGER
BRUXELLES	OSAKA	WIEN	WIEN	MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

K. HÖFLER	E. PERNER	K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN
WIEN	HANNOVER	BONN

BAND LIII, HEFT 1
MIT 140 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 13. OKTOBER 1960



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1961

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich, oder

Prof. Dr. E. Perner, Botanisches Institut der Tierärztlichen Hochschule, Hannover-Kirchrode, Bünteweg 17, Westfalenhof, Deutschland, oder

Dozent Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Zentral-Laboratorium für angew. Übermikroskopie der Universität Bonn, Poppelsdorfer Schloß, Deutschland

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5

Fernsprecher: 63 96 14 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10%, der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Beschäfer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separat ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

LIII. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

Abhandlungen

Wehrmeyer, W.: Untersuchungen zur Spaltöffnungs-doppelbildung	1
Fetzmann, Elsalore: Beobachtungen an Inhaltskörpern von <i>Callithamnion granulatum</i>	11
Burian, K.: Über Chloroplastenkontraktion bei <i>Closterium lunula</i> und deren Reversibilität	19
Jarosch, R.: Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper I	34
Zurzycki, J., and W. Starzecki: Photosynthesis of <i>Helodea canadensis</i> after Vital Staining with Rhodamine B	57
Nakazawa, S.: Dynamics of Morphogenetic Fields	76
Käppner, W.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe <i>Chaos chaos</i> L.	81
Thaler, Irmtraud: Virus-Eiweißkristalle in <i>Phajus grandifolius</i>	106
Kiermayer, O.: Elektive Vitalfärbung der Sekretidioblasten von <i>Helianthus annuus</i>	113
Lamprecht, Ingrid: Die Feinstruktur der Plastiden von <i>T. adscantia albiflora</i> (Kth.) bei Eisenmangelchlorose I	118

Referate

148

Die internationale Zeitschrift Protoplasma wurde von uns im Jahre 1926 begründet. Seitdem haben wir zuerst allein, später mit Karl Höfler und einer Reihe von Mitherausgebern die Redaktion geführt, 34 Jahre hindurch. In diesen vielen Jahren hat die Zeitschrift eine weltweite Verbreitung gefunden. Nunmehr scheint es uns an der Zeit, unseren Anteil an der Redaktion anderen Kräften zu übergeben. Daher sind Manuskripte von nun an zu senden an:

*Professor Dr. Karl Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut der
Universität Wien, Wien I., Dr.-Karl-Lueger-Ring 1*

oder

*Professor Dr. E. Perner, Botanisches Institut der Tierärztlichen
Hochschule Hannover, Hannover-Kirchrode, Bünteweg 17, Westfalenhof*

oder

*Dozent Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Zentral-Laboratorium für angew. Übermikroskopie der Universität
Bonn, Bonn, Poppelsdorfer Schloß.*

Herbst 1960

J. Spek

F. Weber

F. Weber †

Diese Notiz hat Professor Weber wenige Tage vor seinem Tode dem Verlag zur Veröffentlichung übergeben. Der Verlag betrauert in dem Dahingeshiedenen nicht nur den Begründer und verantwortlichen Herausgeber der Zeitschrift Protoplasma, sondern auch den warmherzigen Freund und Berater. Eine Würdigung seiner wissenschaftlichen Leistung und Bedeutung wird von berufener Stelle gegeben werden.

Der Verlag

S

D

Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen zur Spaltöffnungs-doppelbildung

Von

W. Wehrmeyer

Aus dem Institut für Botanik der Technischen Hochschule Hannover

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. März 1960)

Im Normalfall treten die Stomata dikotyler Pflanzen als Einzelspaltöffnungen auf. Das benachbarte Vorkommen von zwei und mehr Spaltöffnungen ist daher stets als ein Sonderfall bzw. als eine pathologische Erscheinung betrachtet worden (Gertz 1919, Kropfitch 1951 a und b, Weber und Kenda 1952, Bünning und Biegert 1953, Kenda und Thaler 1953, Meyer 1953, Neubauer und Apandi 1959; Zusammenfassung bei Reuter 1955, S. 68 ff.). Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Tabakpflanzen wurden benachbarte Spaltöffnungen verschiedentlich angetroffen. Während diese in den Epidermen der Laub-, Kelch- und Blütenblätter und in der Epidermis der Samenkapsel nur gelegentlich beobachtet wurden, konnten sie an den Keimblättern des Tabaks unter völlig normalen Bedingungen immer wieder festgestellt werden. Benachbarte Spaltöffnungen an Keimblättern fanden auch Reese (1950) bei *Lepidium*, Bünning und Biegert (1953) an *Allium*-Keimlingen und Neubauer und Apandi (1959) bei *Bauhinia purpurea* L. und *Cassia*-Sämlingen.

Material und Methode

Für die Untersuchungen stand Saatgut vom Tabak *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun (Samsuntabak) und cv. White Burley (White-Burley-Tabak) zur Verfügung.

Die Abhängigkeit der Spaltöffnungsverteilung von äußeren Faktoren, wie Hydratur, Ernährung, Temperatur und Licht, ist bekannt (Hydratur und Licht: Literaturzusammenfassung bei Schürmann 1959; Ernährung: Firbas 1931, Mothes 1932, Müller-Stoll 1947, Simonis 1948; Temperatur: Tumanow 1927). Daher erfolgten nach einigen Gewächshausvorversuchen die Anzuchten in einer regelbaren Klimakammer unter

gleichbleibenden Temperatur-, Feuchtigkeits- und Lichtbedingungen (tags 18° C, 55% rel. Feuchte; nachts 12° C, 90% rel. Feuchte). Die Belichtung der Keimpflanzen erfolgte 16 h/d durch Kunstlicht (7 Osram-Leuchtstofflampen, und zwar sechs vom Typ L 40 W/32 und eine vom Typ L 40 W/63). Nähere Angaben über die lichtphysiologische Versuchsanlage finden sich bei Ruge

(1954). Auf eine möglichst gleichmäßige Aussaat in Pikiererde gleichbleibender Zusammensetzung ist bei der Anzucht der Keimpflanzen zu achten.

Die ersten mikroskopischen Untersuchungen setzten 7–13 Tage nach der Aussaat, gleich nach dem Erscheinen der Keimblätter, ein. Zur Entlüftung der Interzellularen wurden die Kotyledonen der verschiedenen Entwicklungsstadien mit Wasser infiltriert und die Anzahl der Spaltöffnungs-doppelbildungen pro Keimblattunterseite an 872 Keimblättern ermittelt. Um eine zahlenmäßige Vorstellung über die Verteilung der normalen Spaltöffnungen zu bekommen, erfolgte eine Bestimmung der Epidermiszellen je mm² und der Spaltöffnungen je mm² an 110 Keimblättern früher Entwicklungsstadien, wobei jeweils mindestens zehn Blickfelder pro Blatt ausgezählt wurden. Ausdifferenzierte und unausdifferenzierte Spaltöffnungen

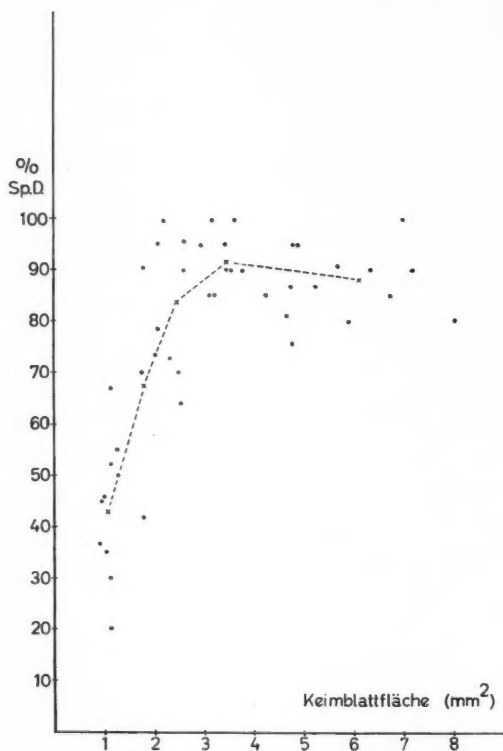


Abb. 1. Prozentuale Häufigkeit der Spaltöffnungs-doppelbildungen auf der Keimblattunterseite des Samsuntabaks in Abhängigkeit von der Blattentwicklung.

und Doppelbildungen sind bei der Gesamtzahl der Spaltöffnungen zusammengefaßt. Die Entnahme des Untersuchungsmaterials erfolgte in Form von Stichproben jedoch so, daß ein möglichst einheitliches Blattmaterial zur Untersuchung kam. Gleich große Blätter sind nur bei lockerer Aussaat als physiologisch gleichwertig zu betrachten; zurückgebliebene bzw. unterdrückte Pflanzen zeigen im Vergleich mit jüngeren Keimpflanzen bei gleich großer Keimblattfläche abweichende Zahlenverhältnisse. Die Keimblattflächen wurden aus den linearen Größen der Laminalänge und -breite als

Ellipsenflächen bestimmt; diese Annäherung ist für die untersuchten jüngeren Keimblätter hinreichend genau.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen stand ein Dialux der Firma Leitz zur Verfügung. Die Mikrophotographien wurden mit einer Leica in Verbindung mit dem Mikroansatz „Mikas“ der Firma Leitz ausgeführt.

Quantitative Untersuchungen zum Vorkommen der Spaltöffnungsdoublebildungen (Sp. D.)

Benachbarte Stomata, überwiegend Spaltöffnungsdoublebildungen (im folgenden Sp. D.), befinden sich ausschließlich auf der Keimblattunterseite. Beim langsam wachsenden White-Burley-Tabak treten Sp. D. nur selten und in geringer Zahl auf; diese Tabaksorte fiel daher für die weiteren Untersuchungen aus. Beim raschwüchsigen Samsuntabak dagegen wurden Sp. D. bei einem hohen Prozentsatz der Pflanzen aller Anzuchten angetroffen. Die Häufigkeit der Sp. D. beim Samsuntabak hängt in starkem Maße vom Entwicklungsstadium der Blätter ab. Die frühesten mikroskopischen Untersuchungen an Keimblättern sind kurz vor deren Entfaltung möglich; die Blätter sind dann etwa 1 mm breit und 1,4 mm lang. Unter den 872 untersuchten Blättern befanden sich 93 mit einer Keimblattfläche um 1 mm²; davon wiesen nur 35,3% Sp. D. auf mit einer mittleren Sp.-D.-Zahl je Keimblatt von 1,5; den Hauptanteil stellten die 779 Blätter mit einer Keimblattfläche > 1,5 mm²; bei diesen erhöht sich die Häufigkeit der Sp. D. auf 83%, die mittlere Sp.-D.-Zahl je Keimblatt auf 2,9.

Abb. 1 zeigt die prozentuale Häufigkeit der Sp. D. in Abhängigkeit von der Blattentwicklung. Die Häufigkeit der Sp. D. steigt also mit dem Flächenwachstum der Lamina an und erreicht bei einer Keimblattfläche von 3 bis 4 mm² ihr Maximum. Mit dem weiteren Wachstum der Blätter tritt dann ein leichter Abfall der prozentualen Häufigkeit der Sp. D. ein. Die einzelnen Punkte in Abb. 1 beziehen sich auf meist zwanzig Keimblattzählungen aus sieben verschiedenen Tabakanzuchten. Die Zahl der Sp. D. pro Keimblattunterseite schwankt zwischen 0 und 13. Für die 779 Keimblätter (> 1,5 mm²) ergibt sich folgende Aufteilung der Sp. D. pro Keimblatt.

0	1	2	3	4	5	> 5
17,3%	21,8%	19,9%	14,8%	11,0%	6,9%	8,3%

Die Sp. D. verteilen sich auf der Keimblattunterseite unter Bevorzugung des reservestoffreicheren Laminabereichs, ohne das Muster der normalen Spaltöffnungen zu verändern.

Die Zunahme der Gesamtzahl der Spaltöffnungen und die des Quotienten aus der Anzahl der Spaltöffnungen/Epidermiszellen (Sp./Ep.-Quotient: Salisbury 1928 und 1932, Smith 1937, Schürmann 1959) mit zunehmender Keimblattfläche ist dem Steigungsgrad der Schwerpunktslinien entsprechend zunächst stark und wird dann geringer (Abb. 2 und 3).

Ein Vergleich der Sp.-D.-Häufigkeit (Abb. 1) mit der Zunahme der Gesamtzahl der Spaltöffnungen (Abb. 2) zeigt, daß die Sp.-D.-Entwicklung

zeitlich in die Phase der stärksten Spaltöffnungsbildungen hineinfällt. Entsprechendes läßt sich aus der Darstellung des Sp./Ep.-Quotienten (Abb. 3) ablesen. Dieser steigt mit dem Flächenwachstum der Keimblätter an, d. h. die Spaltöffnungen nehmen im Vergleich mit den Epidermiszellen im Zuge der Blattentwicklung relativ stärker zu oder die inäqualen Teilungen, die

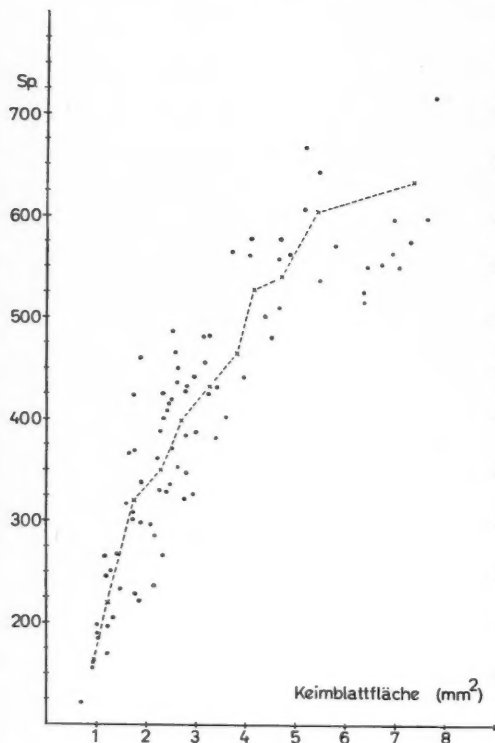


Abb. 2.

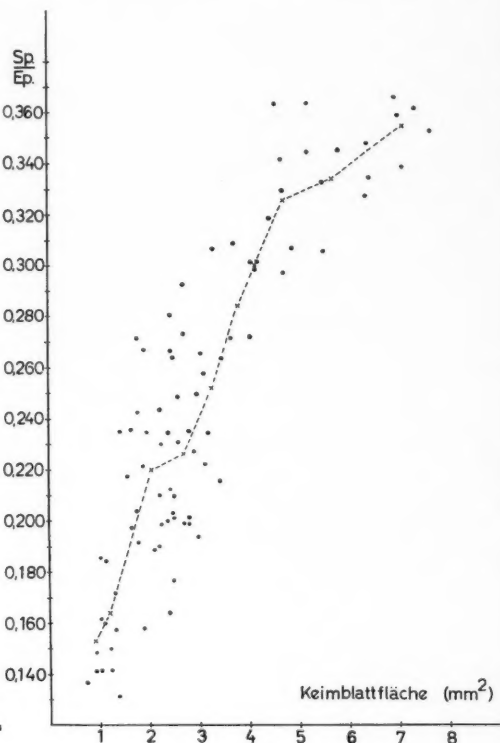


Abb. 3.

Abb. 2 und 3. Zunahme der Gesamtzahl der Spaltöffnungen und des Sp./Ep.-Quotienten mit der Keimblattentwicklung. Die Spaltöffnungsdoppelbildung, die nach Abb. 1 bei 3–4 mm² Keimblattfläche ihr Maximum erreicht, fällt in die Phase stärkster Spaltöffnungsbildung.

zur Spaltöffnungsbildung führen, treten auf, wenn die allgemeine Teilungstätigkeit der Epidermiszellen praktisch aufgehört hat (B ü n n i n g und S a g r o m s k y 1948, B ü n n i n g und B i e g e r t (1953). Die Sp.-D.-Entwicklung fällt zeitlich wiederum in die Phase der stärksten Spaltöffnungszunahme; es ist aber im Vergleich der Abb. 1 mit den Darstellungen in Abb. 2 und 3 auffällig, daß nach ähnlich verlaufender Anfangsphase die Fähigkeit zur Doppelbildung früher nachläßt als die zur normalen Spaltöffnungsbildung.

Aussehen der Spaltöffnungsdoublebildungen

Es können zwei oder drei Spaltöffnungen benachbart liegen; Spaltöffnungsdrillinge kommen allerdings nur recht selten (1,2%) zur Beobachtung. Gehen wir von dem zahlenmäßig bei weitem überwiegenden Fall der Sp. D. aus, so ergeben sich drei Anordnungstypen: Die beiden benachbarten Spaltöffnungen liegen nebeneinander (lateral; Abb. 4), sie liegen hintereinander

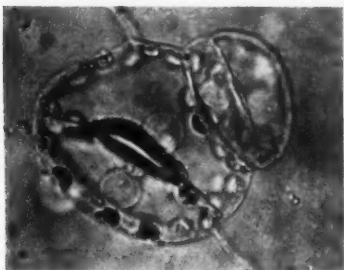


Abb. 4.

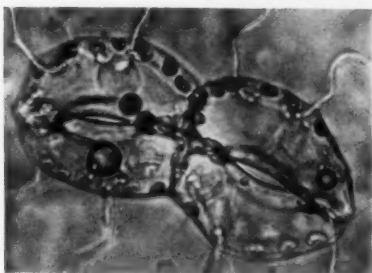


Abb. 5.

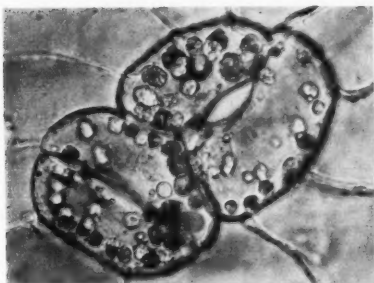


Abb. 6.

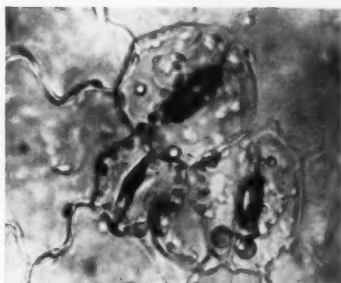


Abb. 7.

Abb. 4, 5, 6 und 7. Laterale, serielle und adossierte Spaltöffnungsdoublebildung und ein Spaltöffnungsdrilling; Abb. 6 von der Kapselaußenwand, die übrigen von der Keimblattunterseite des Samsunstabaks, Vergr. Abb. 4 850 \times , Abb. 5 770 \times , Abb. 6 650 \times , Abb. 7 750 \times .

(serial; Abb. 5 und 8), oder die Spaltenrichtungen der beiden Spaltöffnungen stehen aufeinander senkrecht (adossiert; Abb. 6 und 9).

Bei 779 untersuchten Keimblättern mit insgesamt 1887 Sp. D. befanden sich 45,3% laterale, 28,8% serielle und 25,9% adossierte Anordnungen. Bei den untersuchten Keimblättern wurden 23 Spaltöffnungsdrillinge beobachtet (Abb. 7). Es finden sich die gleichen Anordnungstypen entweder rein (3 Spaltöffnungen lateral oder serial) oder auch kombiniert wieder. Durch Schrägversetzung der Spaltöffnungen kommen auch Übergangsformen zwischen den genannten Typen zustande. Vergleichen

wir die Größen der einzelnen Paare miteinander, so überwiegen gleich große Spaltöffnungen, es kommen aber auch erhebliche Größenunterschiede zwischen den benachbarten Spaltöffnungen vor (Abb. 4). Nicht immer wird die Ausbildung von zwei kompletten Spaltöffnungen er-

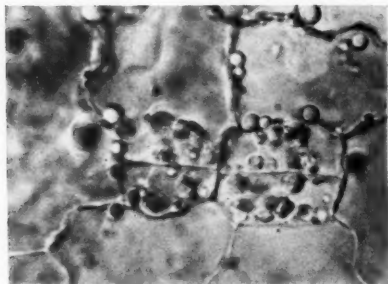


Abb. 8.

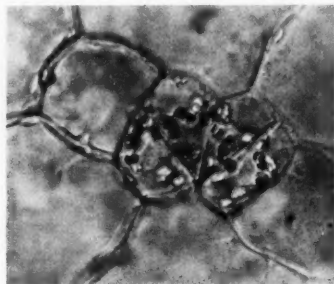


Abb. 9

Abb. 8 und 9. Entwicklungsstadien für die serielle und adossierte Spaltöffnungsdoppelbildung von der Keimblattunterseite des Samsuntabaks. Vergrößerungen Abb. 8 750 \times , Abb. 9 650 \times .

reicht. Es kann der Teilungsschritt, der sonst zur Schließzellenbildung führt, in einer der beiden Spaltöffnungsmutterzellen unterbleiben, und es kommt

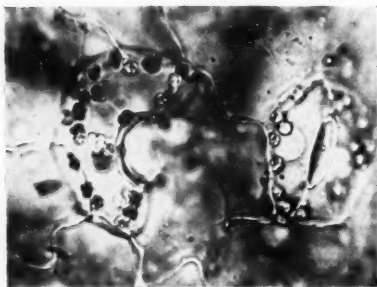


Abb. 10.

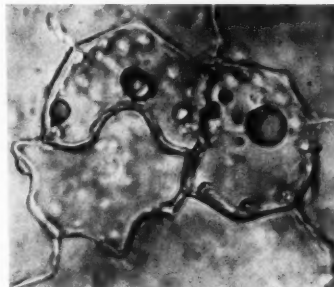


Abb. 11.

Abb. 10 und 11. Umdifferenzierung von prospektiven Schließzellen zu Epidermiszellen. Diese Umdifferenzierung erfolgt unabhängig von der Gegenwart einer benachbarten funktionstüchtigen Spaltöffnung (Abb. 11). Vergrößerungen Abb. 10 650 \times , Abb. 11 690 \times .

zur Persistenz der Spaltöffnungsmutterzelle. In anderen Fällen erfolgt dieser Teilungsschritt, aber die Differenzierung zu Schließzellen gelingt nicht oder nur partiell, und es kommt zur Ausbildung normaler Epidermiszellen (Abb. 10 und 11). Im ersten Fall bleibt also eine chloroplastenreiche, undifferenzierte Zelle in der Nachbarschaft einer ausdifferenzierten Spaltöff-

nung bestehen und hebt sich von den chloroplastenarmen ausdifferenzierten Epidermiszellen der Umgebung ab. Sie kann die Größe der benachbarten Spaltöffnung aufweisen oder auch erheblich kleiner bleiben. Bei den 779 untersuchten Keimblättern ($> 1,3 \text{ mm}^2$) wurden 173 persistierende Spaltöffnungsmutterzellen festgestellt, wobei ein zahlenmäßiger Anstieg mit dem Alter der Keimblätter zu beobachten war. Die 93 untersuchten jüngeren Entwicklungsstadien wiesen überhaupt keine entsprechenden Bildungen auf.

Die Umdifferenzierung von prospektiven Schließzellen zu normalen Epidermiszellen kommt nicht so häufig zur Beobachtung, da die Umdifferenzierung nur dann eindeutig zu erkennen ist, wenn nur eine Schließzelle der Spaltöffnung erfaßt wird (Abb. 10 und 11). Daß eine Umdifferenzierung erfolgt, wurde oben schon aus dem Abfall der prozentualen Häufigkeit der Sp. D. im Zuge der Keimblattentwicklung indirekt erschlossen. Die Determination der Initialen und ihrer beiden Tochterzellen ist also nicht endgültig. Schließzellen können zu Epidermiszellen werden; sie können ein selbständiges, voneinander unabhängiges Wachstum zeigen, wobei sie sich nicht mehr als „Spaltöffnungseinheit“ verhalten (Bünning und Biegert 1953).

Der Vollständigkeit halber seien noch einige weitere Erscheinungsformen der Sp. D. genannt, die fast ausschließlich auf ältere Keimblätter beschränkt sind. Durch Zellnekrose können wie bei den normalen Spaltöffnungen auch einzelne Schließzellen der Doppelbildung an sonst ungeschädigten Keimblättern ausfallen. Der Raum der abgestorbenen und daher nicht mehr turgeszenten Zelle wird von den Nachbarzellen ausgefüllt (Obliteration). Dadurch kommen Bilder zustande, die den in der Literatur beschriebenen sog. „dreizähligen“ Spaltöffnungen entsprechen; dabei liegt der normalen Spaltöffnung bei ursprünglich lateraler Anordnung eine dritte Schließzelle seitlich an. Nicht nur im Keimblattbereich, sondern auch an den Kelchblättern und der Samenkapsel des Tabaks wurden Zellnekrosen dieser Art beobachtet (vergl. auch Gertz 1919).

Ferner können am Aufbau einer Spaltöffnung drei Schließzellen beteiligt sein. Dabei kommt es zu Störungen, und eine Zelle geht schließlich zugrunde.

Entwicklung der Spaltöffnungsdoppelbildungen

Zur Frage des Entwicklungszeitpunktes der Sp. D. sind oben schon einige Angaben gemacht. Danach erfolgt die Sp. D. im Zuge des Flächenwachstums der Keimblätter, und zwar setzt sie bei einer Keimblattfläche von wenig unterhalb 1 mm^2 ein, erreicht ein Maximum bei etwa 4 mm^2 und fällt damit zeitlich in die Phase stärkster Spaltöffnungsbildung hinein.

Die normale Spaltöffnungsbildung geht aus von einer Initialen, die durch inäquale Teilung einer Epidermiszelle entsteht (Zepf 1952, Bünning und Biegert 1953). Die Spaltöffnungsdoppelbildung setzt dementsprechend die Entstehung zweier benachbarter Initialen voraus. In Erweiterung unserer bisherigen Vorstellungen (siehe Diskussion) wird im vorliegenden Falle die Bildung benachbarter Spaltöffnungsinitialen von zwei benachbarten Epidermiszellen her durch eine Vielzahl lichtmikroskopisch beobachtbarer Frühstadien der Entwicklung nahegelegt (Abb. 12 und 13).

In vielen Fällen ist eine eindeutige räumliche Zuordnung der benachbarten Initialen zu zwei Epidermiszellen möglich. Oft zeigen diese Initialen auffällige Größenunterschiede (Abb. 13) und lassen ungleiche Spaltöffnungs-paare aus sich hervorgehen (Abb. 4). Durch die zweifache Initialenentstehung wird auch das Vorkommen von adossierten Spaltöffnungen verständlich, die mit 25,9% doch ein Viertel aller beobachteten Sp. D. ausmachen. Bemerkenswert ist ferner das benachbarte Vorkommen von unterschiedlichen Entwicklungsstadien. So wurden Spaltöffnungsmutterzellen und -tochterzellen, undifferenzierte und ausdifferenzierte Spaltöffnungen, persistierende Spaltöffnungsmutterzellen und ausgebildete Spaltöffnungen un-

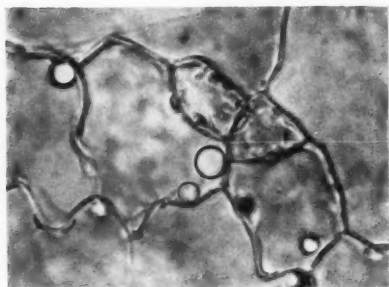


Abb. 12.

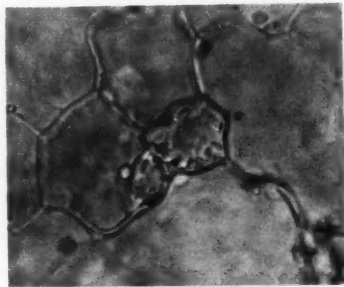


Abb. 13.

Abb. 12 und 13. Entstehung benachbarter Initialen von zwei benachbarten Epidermiszellen her. Vergr. 775 \times .

mittelbar nebeneinander beobachtet. Schließlich sprechen auch die Befunde über drei benachbarte Spaltöffnungen für die Annahme mehrfacher Initialenbildung und voneinander unabhängiger Weiterdifferenzierung.

Die Zahlenangaben über die Häufigkeit von Spaltöffnungsdoppelbildungen im Zuge der Keimblattentwicklung (Abb. 1) umfassen die undifferenzierten und ausdifferenzierten Sp. D. Das Absinken der prozentualen Häufigkeit der Sp. D. mit zunehmender Keimblattentwicklung geht wahrscheinlich auf den Anteil der undifferenzierten Schließzellen zurück, der durch Umdifferenzierung zu Epidermiszellen der späteren Beobachtung entgeht. Dieser Anteil ist nur gering. Vergleicht man dagegen die Anzahl benachbarter Initialen mit der endgültigen Sp. D.-Zahl pro Keimblatt, so ergibt sich, daß Umdifferenzierungsprozesse in viel stärkerem Maße in frühen Entwicklungsstadien stattfinden müssen. Ähnliche Befunde machten auch Bünning und Biegert (1953) an *Allium*-Keimlingen.

Initialen treten ferner nicht nur paarweise, sondern auch in Gruppen auf; jedoch zeigt ein Vergleich der Anzahl der gefundenen Spaltöffnungsdrillinge mit den beobachtbaren „Initialennestern“, daß bei ihnen die Weiterentwicklung und Differenzierung sehr häufig Abwandlungen und Störungen erfahren kann.

Diskussion

Das Auftreten der Spaltöffnungsdoublebildungen an der Keimblattunterseite des Samsuntabaks kann als ein Sonderfall der Spaltöffnungs-differenzierung, nicht aber als pathologisch angesehen werden. Es besteht weder ein kausaler Zusammenhang mit einer Virusinfektion (Weber und Kenda 1952) noch mit einer Pilzinfektion (Meyer 1955); auch ist eine Beeinflussung der Spaltöffnungsentwicklung durch UV-Strahlung (Kropfitch 1951b) oder durch Wundreiz (Neubauer und Apandi 1959) auszuschließen. Vielmehr treten die Sp. D. bei einem hohen Prozentsatz der völlig gesunden Keimpflanzen aller Anzuchten des Samsuntabaks auf.

Das regelmäßige Auftreten benachbarter Spaltöffnungen zwingt zur Annahme benachbarter Initialenentstehung und einer entsprechenden Differenzierungspotenz zu Schließzellen. Die Bildung benachbarter Initialen kann durch einen zusätzlichen äqualen Teilungsschritt der Spaltöffnungsmutterzelle (Weber und Kenda 1952, Jantsch 1959) oder auf Grund eines zusätzlichen inäqualen Teilungsschrittes der epidermalen Stammzelle (Bünning und Biegert 1953) zustande kommen. In der vorliegenden Arbeit wird nun die Möglichkeit aufgezeigt, daß auch von zwei benachbarten Epidermiszellen her durch je einen inäqualen Teilungsschritt benachbarte Initialen gebildet werden können. Das Vorkommen von adossierten Spaltöffnungsdoublebildungen und von Spaltöffnungsdrillingen, die unterschiedliche Größe benachbarter Initialen und die Ungleichheit ihrer Entwicklung und besonders die eindeutige Zuordnung benachbarter Initialen zu zwei Epidermiszellen sprechen für diese Annahme. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen zum Vorkommen von sechs und sieben lateral benachbarten Spaltöffnungen (Kropfitch 1951a und Kenda und Thaler 1953) können vielleicht weitere Aufschlüsse liefern.

Zusammenfassung

Benachbarte Spaltöffnungen (Spaltöffnungsdoublebildungen und -drillinge) treten in der Epidermis der Keimblattunterseite des Samsuntabaks bei einem hohen Prozentsatz völlig gesunder Keimpflanzen unter normalen Bedingungen in meist geringer Anzahl regelmäßig auf. Es wurden quantitative Untersuchungen über das Auftreten der Doublebildungen im Zuge des Keimblattwachstums im Vergleich mit der normalen Spaltöffnungszunahme durchgeführt.

Die verschiedenen Formen der Spaltöffnungsdoublebildung werden beschrieben und entwicklungsgeschichtlich untersucht. Die Entwicklung der Spaltöffnungsdoublebildung kann danach von zwei Initialen ausgehen, die durch je einen inäqualen Teilungsschritt von zwei benachbarten Epidermiszellen her sich ableiten. Nur einem Teil der so entstandenen benachbarten Initialen gelingt die normale Ausdifferenzierung zu funktionstüchtigen Spaltöffnungen. Offensichtlich kommt es besonders auf der Stufe der Initialen, seltener auf dem Stadium der Spaltöffnungstochterzellen zur Umdifferen-

zierung zu normalen Epidermiszellen; für ältere Keimblätter ist daneben die Persistenz von Spaltöffnungsmutterzellen in der Nachbarschaft ausdifferenzierter und undifferenzierter Spaltöffnungen beobachtet.

Literatur

- Bünning, E., und F. Biegert, 1953: Die Bildung der Spaltöffnungsinitialen bei *Allium cepa*. Z. Bot. 41, 17.
- und H. Sagromsky, 1948: Die Bildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis. Z. Naturforsch. 3 b, 203.
- Firbas, F., 1951: Untersuchungen über den Wasserhaushalt der Hochmoorpflanzen. Jb. wiss. Bot. 74, 457.
- Gertz, O., 1919: Über septierte Stomazellen. Ber. dtsh. bot. Ges. 37, 529.
- Jantsch, B., 1959: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Blatt von *Iris japonica* Thunb. Z. Bot. 47, 536.
- Kenda, G., und I. Thaler, 1953: Spaltöffnungssiebenlinge in der Blütenepidermis von *Aristolochia grandiflora*. Phytion 4, 511.
- Kropfisch, M., 1951 a: Apfelgas-Wirkung auf Stomatazahl. Protoplasma 40, 256.
- 1951 b: UV-Bestrahlung und Stomatazahl. Protoplasma 40, 266.
- Meyer, Jean, 1955: Multiplication des stomates sous l'action du *Peronospora parasitica* (Pers.) Bull. Soc. bot. France 102, 6.
- Möthes, K., 1932: Ernährung, Struktur und Transpiration. Biol. Zbl. 52, 195.
- Müller-Stoll, W., 1947: Der Einfluß der Ernährung auf die Xeromorphie der Hochmoorpflanzen. Planta 35, 225.
- Neubauer, H. F., und A. Apandi, 1959: Über Unregelmäßigkeiten in der Entwicklung und über Mißbildungen des Spaltöffnungsapparates. Protoplasma 50, 290.
- Reese, G., 1950: Beiträge zur Wirkung des Colchicins bei der Samenbehandlung. Planta 38, 324.
- Reuter, L., 1955: Protoplasmatische Pflanzenanatomie. Protoplasmatologia Bd. XI/2. Springer-Verlag, Wien.
- Ruge, U., 1954: Anzucht von Pflanzen bei ausschließlich künstlicher Beleuchtung. Z. Bot. 42, 51.
- Salisbury, E. J., 1927: On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora. Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B. 216, 1.
- 1932: The interrelation of soil, climate and organism and the use of stomatal frequency as an intergrating index of the water relations of the plant. Beih. Bot. Zbl. 49, 408.
- Schürmann, B., 1959: Über den Einfluß der Hydratur und des Lichtes auf die Ausbildung der Stomata-Initialen. Flora 147, 471.
- Simonis, W., 1948: CO₂-Assimilation und Xeromorphie von Hochmoorpflanzen in Abhängigkeit von Wasser- und Stickstoffgehalt des Bodens. Biol. Zbl. 67, 77.
- Smith, H. B., 1937: Number of stomata in *Phaseolus vulgaris* studied with the analysis of variance technique. Amer. J. Bot. 24, 384.
- Tumanow, J. J., 1927: Ungenügende Wasserversorgung und das Welken der Pflanzen als Mittel zur Erhöhung ihrer Dürresistenz. Planta 3, 591.
- Weber, Fr., und G. Kenda, 1953: Stomata-Anomalie von *Opuntia*-Virus-trägern. Österr. bot. Ztg. 100, 155.
- Weissenböck, K., 1948: Studien an colchizinierten Pflanzen. I. Phytion 1, 282.
- Zepf, E., 1952: Über die Differenzierung des *Sphagnum*-Blattes. Z. Bot. 40, 87.

Beobachtungen an Inhaltskörpern von *Callithamnion granulatum*

Von

Elsalore Fetzmann

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. Februar 1960)

Einleitung

Die im folgenden untersuchte Rotalge *Callithamnion granulatum* (Ducl.) J. Ag. wurde von Prof. Dr. Karl Höfler zusammen mit verschiedenen anderen Meeresalgen zu Ostern 1959 bei Lovrana (Jugoslawien) aus der Adria persönlich aufgesammelt und lebend mit nach Wien ins Pflanzenphysiologische Institut gebracht. *Callithamnion granulatum* fiel dadurch auf, daß es in den meisten Zellen eigenartige runde Inhaltskörper aufwies. Um Tonoplasten, wie wir anfangs meinten, konnte es sich dabei nicht handeln, da diese wohl nur nach Einwirkung hypertonischer Lösung sichtbar würden (vgl. Biebl 1958). Über einige Versuche, die mit dieser Alge angestellt wurden, um die Natur der Inhaltskörper aufzuklären, soll im folgenden berichtet werden.

Callithamnion granulatum (Ducl.) J. Ag. gehört zu den Ceramiaceen und ist im Mittelmeer beheimatet (Hauk 1885; Funk 1927, 1955; Feldmann 1940). Es besitzt reichlich allseitig verzweigte Stämmchen, die nur in den untersten Abschnitten berindet sind. Die oberen Ästchen sind fast regelmäßig dichotom verzweigt und bilden dichte Büschel (abgebildet bei Kützing 1846—71, Tabulae phycologicae, XII; Feldmann 1940, p. 480). Tetrasporangien waren an dem Material recht häufig. Die einzelnen Zellen zeigen bei Scharfeinstellung der oberen Zellbegrenzung schön das „puzzle“ der intakten Rhodoplasten (Abb. 1, vgl. auch Biebl 1956) und darüber noch reichlich stark lichtbrechende Mikrosomen, die nach wochenlanger Kultur stark vermehrt erschienen, während die inzwischen farbloser und zarter gewordenen Rhodoplasten kaum sichtbar waren.

Bei tieferer Einstellung der optischen Ebene sind im Großteil der Zellen gelblichweiß schimmernde, annähernd kugelförmige Gebilde zu sehen, die

mit einer scharfen Grenzlinie gegen den übrigen Zellsaftraum abgeschlossen sind (Abb. 2, 4). Oft ist nur ein solcher Körper vorhanden, oft aber zahlreiche, die dann kleiner sind als die einzelnen. Interessant ist, daß im Dunkelfeld diese Kugeln grauweiß aufstrahlen, während die übrige Zelle dunkel bleibt (Abb. 3, 5). Eine Zelle, die $135\ \mu$ lang und $36\ \mu$ breit war, zeigte im Inneren eine Kugel von $34,5\ \mu$ Durchmesser. In Seitenästchen fanden sich solche von $18,4\ \mu$ Durchmesser oder längliche Ovale mit



Abb. 1.



Abb. 2.



Abb. 3.

Abb. 1. Rhodoplasten bei hoher Einstellung der optischen Ebene.

Abb. 2. Bei tieferer Einstellung sieht man den großen, ovalen Inhaltskörper in der Zelle.

Abb. 3. Im Dunkelfeld leuchtet die Kugel grauweiß auf.

den Abmessungen $18,9\ \mu$ und $27\ \mu$. Im ultravioletten Licht zeigt sich, daß die Zellen mit den Kugeln noch ganz ungeschädigt sind, da sie schön dunkelrot fluoreszieren, während tote Zellen, deren Phycoerythrin-Farbstoff in den Zellsaft ausgetreten ist, grell gelbrot aufleuchten (vgl. Wimmer und Höfler 1953, Höfler und Düvel 1954, Höfler 1956).

Versuche

Zur näheren Untersuchung wurden kleine Stämmchen von *Callithamnion* zunächst 20 min bei 2500 Touren zentrifugiert. Fast nirgends waren die Plastriden verlagert, nur in einigen Zellen waren die Inhaltskörper verlagert und sogar deformiert wie etwa eine knetbare Masse (Abb. 6). Immer lagen

sie, falls sie verlagert wurden, am zentrifugalen Zellende. Bei einstündiger Zentrifugierung waren auch die Rhodoplasten teilweise verlagert. Die Inhaltskörper und Mikrosomen waren meist ganz verlagert.

Sodann wurde die Alge plasmolysiert. In 3fachem Seewasser (SW) tritt schon nach 1–2 min starke, buchtige Plasmolyse ein (vgl. Höfler 1931 über die Plasmolyse bei Rotalgen), wobei der Inhaltskörper sich nicht osmotisch in seiner Größe ändert, sondern nur zwischen den Buchten ge-



Abb. 4.

Abb. 4. Zweigstück im Hellfeld. Fast in jeder Zelle liegen ein oder mehrere Inhaltskörper.



Abb. 5.

Abb. 5. Ein Zweigstück im Dunkelfeld.

quetscht wird. Saugt man wieder einfaches SW durch das Präparat, so geht die Plasmolyse sofort zurück. Der gut sichtbare Inhaltskörper ist nur leicht verquetscht und nimmt erst nach einigen Minuten seine kugelige Gestalt an (Abb. 7 a, b, c). Die Zelle selbst ist noch völlig intakt, die Rhodoplasten zeigen das typische „puzzle“. Fast alle Zellen lassen sich noch einige Male plasmolysieren und deplasmolysieren, wobei das Plasma stets an den gleichen Stellen von der Wand gelöst wird.

Zur Bestimmung des osmotischen Wertes wurde eine abgestufte SW-Konzentrationsreihe verwendet, die bewies, daß *Callithamnion granulatum* höhere Werte zeigt als die Mehrzahl der anderen bis jetzt untersuchten Rotalgen (Höfler 1931, Biebl 1937 a, b).

3,0 SW: stark buchtige Plasmolyse

2,5 SW: große Buchten

2,0 SW: nur ganz kleine Buchten, nicht in allen Zellen.

1,5 SW: keine Plasmolyse mehr.

In weiteren Versuchen wurde *Callithamnion granulatum* mit verschiedenen Farbstoffen vitalgefärbt. Legt man kleine Teile eines Stämmchens in eine Neutralrotlösung (1 : 10.000 in SW, also ca. pH 8,2), so färben sich nur geschädigte Zellen, in denen die Rhodoplasten schon abgekugelt sind

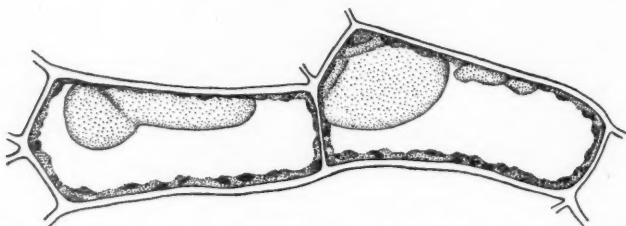


Abb. 6. *Callithamnion granulatum*, zentrifugiert. Die Inhaltskörper sind verlagert.

oder tropfenförmige Gestalt angenommen haben, diffus rot an, während die Kugeln dunkelrot erscheinen. In den Zellen, die ganz gesund sind und völlig intakte Rhodoplasten aufweisen, färben sich vornehmlich

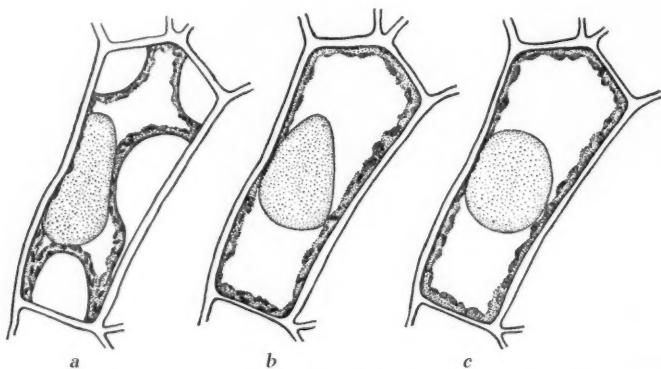


Abb. 7. *Callithamnion granulatum*. a Plasmolyse in 3,0 SW; b Deplasmolyse. Nur der Inhaltskörper ist noch deformiert; c Nach 5 min ist auch der Inhaltskörper wieder abgerundet.

die Inhaltskörper, und zwar schön erdbeerrot an. Dieser Farbton zeigt an, daß das Neutralrot nicht an irgendwelche Farbe speichernde Stoffe chemisch gebunden ist. Saugt man $n/10$ NH_3 durch das mit Neutralrot gefärbte Präparat, so entfärbt sich die ganze Zelle, nur in den Kugeln wird die Farbe, jetzt stark gelborange, festgehalten. Diese Reaktion könnte darauf hindeuten, daß Lipide an der Zusammensetzung dieser Inhaltskörper maßgeblich beteiligt sind (vgl. K i n z e l 1954, 1958, H ö f l e r und S c h i n d-

ler 1955). Erst nach Durchsaugen einer Koffeinelösung (1%) werden auch die Kugeln entfärbt. Daß die Zellen hierbei nicht abgetötet worden waren, bewies eine nachfolgende Plasmolyse in 3,0 SW, die in den meisten Zellen noch starke Buchten hervorrief. Bei neuerlicher Neutralrotfärbung traten die Kugeln wieder schön erdbeerrot hervor.

Bei Anfärbung mit Nilblausulfat (bei pH 10,7) werden die jungen Zweigspitzen oft hellblau gefärbt, während in älteren Zellen nur die Kugeln zartblau erscheinen. Bei stärkerer Färbung sind die Zellen blau, die Kugeln aber tiefblau. Viele Zellen sterben aber ab, wie eine nachfolgende Plasmolyse mit 3,0 SW zeigt. Im UV-Licht zeigen die blauen Kugeln intakter Zellen keine Fluoreszenz, während die Eigenfluoreszenz toter Zellen deutlich sichtbar ist. Saugt man vorsichtig $n/10$ NH_3 durch das Präparat, so färbt sich nur der Protoplast augenblicklich rot, während die Kugeln nach wie vor tiefblau bleiben. Daraus läßt sich schließen, daß nicht Neutralfette in den Kugeln enthalten sind, denn diese müßten sich gelbrot färben (Höfler und Diskus 1957).

Legt man *Callithamnion granulatum* in Brillanteresylblau (ca. 8 min, 1 : 10.000, bei pH 8,4), so färben sich die jungen Zweigenden stark an, und zwar violett. In diesen Zellen sind aber die Rhodoplasten schon stark abgerundet, die Zellen sind offensichtlich durch den Farbstoff geschädigt worden. In den älteren Zweigzellen und in den größeren Stammzellen sind lediglich die Kugeln angefärbt und das in einem rein blauen Farbton. In ganz alten Zellen sind diese Inhaltskörper nicht rund, sondern manchmal eckig und klumpig, dürften also wohl eine festere Konsistenz besitzen. In den Zellen, wo der übrige Protoplast wie die Membran ungefärbt ist, sind auch die Rhodoplasten noch ganz gesund.

Bei Einwirkung von Toluidinblau (in SW) tingieren sich zuerst die Zellwände dunkelviolett. Später zeigt eine Plasmolyse in 3,0 SW, daß die Wände farblos sind, während der Protoplast zart violett und die Kugel aber stärker violett erscheint. Dieser Farbton zeigt, wie der blaue von Brillanteresylblau, das Fehlen von farbstoffspeichernden Komponenten in den Inhaltskörpern (Kinzel 1954, 1958, Höfler und Schindler 1955, Höfler und Diskus 1957).

Rhodamin B färbt die ganze Zelle leicht rosa an, etwas stärker färben sich die Kugeln, auch dies spricht für einen Lipoidgehalt der Kugeln.

In Acridinorangelösung (1 : 10.000 in SW) färben sich nach 5 min die Zellen leicht rosa an, während in fast jeder Zelle eine goldgelb gefärbte Kugel zu finden ist. Manche Zellen sind von mehreren Kugeln oft ganz erfüllt. Im UV-Licht leuchten die Kugeln in sattem Rostrot auf (diese Reaktion läuft gleichsinnig mit den übrigen Farbeergebnissen, vgl. Höfler 1946, 1947, 1949, Kinzel 1958, Diannelidis und Höfler 1959). Der übrige Zellinhalt leuchtet in dunklerem Rot, während die Membranen an manchen Stellen ganz durchsichtig zart grünblau fluoreszieren.

Vergleicht man das Verhalten der Inhaltskörper von *Callithamnion granulatum* verschiedenen Vitalfarbstoffen gegenüber mit dem der Elaioplasten von *Laurencia obtusa* (Diannelidis und Höfler 1959), so

zeigen sich beträchtliche Unterschiede. Neutralrot färbt bei *Callithamnion* die Inhaltskörper an, während bei *Laurencia* die Elaioplasten farblos bleiben. Ebenso stimmt die Färbung mit Nilblau nicht überein, da im alkalischen Bereich die Elaioplasten orangerot gefärbt sind, während die Kugeln von *Callithamnion* ihre blaue Färbung beibehalten. Acridinorange zeigt im UV-Licht bei *Laurencia* grüne, bei *Callithamnion* dagegen kupferrote Fluoreszenz. Die Inhaltskörper dieser beiden Rotalgen, die allein schon durch die Lage in der Zelle (bei *Laurencia* liegen sie im Plasma, bei *Callithamnion* stets im Zellsaft) verschieden erscheinen, zeigen also durch ihr Verhalten gegenüber Vitalfarbstoffen auch ihre unterschiedliche chemische Beschaffenheit an.

*

Stirbt bei *Callithamnion granulatum* eine Zelle ab, z. B. beim Zusetzen von 50% Alkohol, so entfärben sich die Kugeln und verschwinden vollständig.

Interessant war überhaupt die Beobachtung, daß beim Absterben der Zellen diese Inhaltskörper völlig verschwanden. Dabei wurde zuerst die Kontur unscharf, dann wurde der zuerst helle Fleck undeutlicher. Dieser Vorgang setzte in dem Augenblick ein, sobald die Rhodoplasten sich auflösten und den Farbstoff an die Vakuole abgaben. Die Auflösung dieser Kugeln konnte auch durch Anwendung verschiedener Fixiermittel (Formol, Pfeiffer-Gemisch, 50% Alkohol) nicht verhindert werden. Bei Formol blieben sogar die Rhodoplasten in ihrer Gestalt erhalten, doch die Kugeln waren aufgelöst. Sie verschwanden auch in $n/10$ Schwefelsäure, $n/10$ Kalilauge und $n/10$ Natronlauge.

Nur in konzentrierter Salpetersäure schrumpften die Kugeln zu kleinen granulierten Klumpen, doch bei einem Druck auf das Deckglas zergingen auch diese.

Besprechung

Die Versuche zeigten, daß die eigentümlichen, weißschimmernden Kugeln oder Ovale, die in den meisten Zellen von *Callithamnion granulatum* zu finden sind, flüssige bis zähe Beschaffenheit aufweisen. In der lebenden Zelle sind sie scharf konturiert und liegen frei im Zellsaftraum. Das läßt sich leicht nachweisen, wenn man mit einer dünnen Glasnadel unter dem Mikroskop auf die Zellen drückt. Bei einiger Vorsicht läßt sich die Kugel innerhalb der Vakuole verschieben. Die durchgeführten Vitalfärbungen machen es wahrscheinlich, daß es sich bei den Inhaltskörpern in *Callithamnion granulatum* nicht um Gerbstoffe (keine Fällung mit Koffein) oder ähnliches, oder um schleimige Pektinstoffe (Alkohol löst die Kugeln auf) handelt, sondern daß sie eher lipoidartige Stoffe enthalten dürften; dies ist aus der Art der Nilblaufärbung ersichtlich und auch daraus, daß Neutralrot bei Anwesenheit von NH_3 festgehalten wird.

In der Literatur sind diese Körper noch kaum beachtet, nur Berthold (1882, S. 698/99) beschreibt sie von *Callithamnion granulatum* und stellt

sie in eine Gruppe mit den Elaioplasten von *Laurencia obtusa* (vgl. Diannelidis und Höfler 1959) und den sogenannten „irisierenden Körpern“ bei verschiedenen Rotalgen (vgl. auch v. Faber 1913, Mangenot 1933 u. a.). Diese liegen aber im Protoplasma und nicht im Zellsaft, wie bei *Callithamnion*, stellen also Zellorganellen dar, wie dies besonders für die Ölkörper von *Laurencia obtusa* von Diannelidis und Höfler (1959) erwiesen wurde. Dangeard (1940, 1956) sieht mit einigem Vorbehalt in diesen Körpern Ausbildungen des Vakuoms und reiht sie unter die „vacuoles spécialisées“ ein. Auch Kny (1870) fand in *Chondriopsis coerulea* im Zellsaft blaßgelbe Körper, die das Irisieren hervorriefen. Für alle diese Gebilde nimmt Berthold wie auch andere Autoren (Kylin 1937, 1956; Dangeard 1956) eine Lichtschutzfunktion an. Diese „corps irisantes“, wie sie diese Autoren nennen, liegen in den obersten Zellschichten der betreffenden Thalli und rufen ein auffälliges Blauschimmern dieser Rotalgen hervor. Sie sollen die schädigende Wirkung der Sonnenstrahlen durch Zerstören des Lichtes verhindern und sogar je nach Beleuchtungsintensität verlagert werden können. Bei *Callithamnion* trifft dies aber nicht zu. Ihrem Bau und ihrer Lage nach sind die Kugeln wahrscheinlich im Zellsaft ausgeschiedene Substanzen. Ihrer Anordnung nach finden sie sich in den äußeren Zweigen viel seltener und oft nur in Einzahl, während gerade ältere Zellen im Innern der Zweige oft ganz erfüllt davon sind. Bei längerer Kultur am schattigen Nordfenster nahmen die Kugeln eher noch zu, während die meisten Autoren eine Abnahme der irisierenden Körper im Schatten beobachten konnten.

Bei den Kugeln in *Callithamnion granulatum* dürfte es sich eher um Stoffwechselprodukte handeln, über deren Bedeutung für die lebende Zelle im Augenblick aber nichts ausgesagt werden kann.

Literatur

- Berthold, G., 1882: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Meeresalgen. Jb. wiss. Bot. 13, 569—717.
- Biebl, R., 1936: Untersuchungen an Rotalgenplastiden. Protoplasma 26, 386—412.
- 1937 a: Zur protoplasmatischen Anatomie der Rotalgen. Protoplasma 28, 562—581.
- 1937 b: Ökologische und zellphysiologische Studien an Rotalgen der englischen Südküste. Beih. bot. Cbl. 57. Abt. A, 381—424.
- 1938: Tonoplastenbildung bei *Heterosiphonia plumosa* Batt. Protoplasma 30, 570—576.
- Dangeard, P., 1940: Recherches sur les enclaves iridescentes de la cellule des algues. Le Botaniste, Ser. 31.
- 1956: Le vacuome de la cellule végétale. Morphologie. Protoplasmatologia 3, D 1.
- Diannelidis, Th., und K. Höfler, 1959: Über die Elaioplasten der Rotalge *Laurencia obtusa*. Protoplasma 50, 590—606.
- Faber, F. C. v., 1913: Organisation und Entwicklung der irisierenden Körper der Florideen. Z. Bot. 5, 801—820.
- Feldmann-Mazoyer, G., 1940: Recherches sur les Cérarniacées de la méditerranée occidentale. Impr. Minerva, Alger.
- Funk, G., 1927: Die Algenvegetation des Golfs von Neapel. Pubbl. Staz. zool. Napoli 7.

- Funk, G., 1955: Beiträge zur Kenntnis der Meeresalgen von Neapel. Pubbl. Staz. zool. Napoli 25.
- Hauck, F., 1885: Die Meeresalgen Deutschlands und Österreichs. Rabenhorsts Kryptogamenflora 2.
- Höfler, K., 1951: Hypotonietod und osmotische Resistenz einiger Rotalgen. Öst. bot. Zeit. 80, 51—71.
- 1946: Sur la coloration vitale des vacuoles par l'orange d'acridine et le rouge neutre. C. r. Acad. sci., Paris 225, No. 7, 335.
- 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13—29.
- 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biologia generalis XIX, 90—115.
- 1956: Über Plastiden und Blaszellen der Rotalgen. Pubbl. Staz. zool. Napoli 28, 255—265.
- und D. Düvel, 1954: Helgoländer Algen im Fluoreszenzmikroskop. Ber. dtsh. bot. Ges. 67, 2—9.
- und H. Schindler, 1955: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. Protoplasma 45, 175—195.
- und A. Diskus, 1957: Vitalfärbung mit Nilblau und Brillantcresylblau. Protoplasma 48, 429—451.
- Kinzel, H., 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. Protoplasma 44, 52—72.
- 1958: Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. Protoplasma 50, 1—50.
- Kny, L., 1870: Über die Morphologie von *Chondriopsis coerulescens* Crouan und die dieser Alge eigenen optischen Erscheinungen. Mber. Akad. Wiss. Berlin.
- Kützing, F. T., 1846—1871: Tabulae phycologicae, Bd. XII.
- Kylin, H., 1937: Anatomie der Rhodophyceen. Handb. Pflanzenanatomie (Linsbauer), 2. Abt., Bd. 6/2, B, g.
- 1956: Die Gattungen der Rhodophyceen. Gleerups Förlag, Lund.
- Mangenot, M. G., 1933: Sur les corps irisants de quelques Rhodophycées. C. r. soc. biol. Paris 112.
- Wimmer, Chr., und K. Höfler, 1953: Über die Eigenfluoreszenz lebender, absterbender und toter Florideenzellen. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 162, 625—641.

Über Chloroplastenkontraktion bei *Closterium lunula* und deren Reversibilität

Von

Karl Burian

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. März 1960)

Einleitung

Die Desmidiacee *Closterium lunula*, der die vorliegenden Untersuchungen galten, zeichnet sich vor anderen Zieralgen durch ihre stattliche Größe (Länge des verwendeten Materials 600 bis 650 μ , Breite etwa 70 bis 90 μ) und die lebhaft strömung ihres Plasmas aus.

Die langgestreckte, in ihrer Längsachse leicht gebogene Alge besitzt eine sehr durchsichtige, in der Längsrichtung leicht skulpturierte Membran. Die Vakuole ist meist vielfach zerteilt (Wabenvakuole, s. Kiermayer 1954), die beiden endständigen Vakuolenteile enthalten Gipskriställchen, die sich bei der ungeschädigten Zelle in lebhafter BMB befinden. Der walzenförmige Chromatophor schließlich besteht aus zwei deutlich voneinander abgesetzten Hälften, deren aufgesetzte Längsrippen nach außen zackig konturiert sind (Abb. 1). Diese Zacken dienen ähnlich wie bei *Netrium digitus* der Befestigung des Chloroplasten im wandständigen Plasma (Kopetzky-Rechtperg 1954).

Die Desmidiaceen sind seit Cholnoky und Höfler (1950) beliebte Objekte der Zellphysiologie (Höfler 1951, Höfler und Schindler 1951, 1953, 1955, Krebs 1951, Loub 1951, Hirn 1953, Kiermayer 1954, E. Huber 1955, Url 1955, Höfler und Diskus 1957). Dabei wurde auch *Closterium lunula* mehrfach zu Versuchen herangezogen. So stellten Höfler und Schindler (1953) fest, „...daß *Closterium lunula* weitaus am empfindlichsten unter allen der Farbbehandlung unterworfenen Desmidiaceen ist“ (vgl. auch Loub 1951).

Kiermayer (1954) führte an *Closterium lunula* Zentrifugierungsversuche durch und Vitalfärbungsstudien mit Neutralrot, wobei er hinsichtlich

Metachromasie und Vakuolenkontraktion teilweise zu etwas abweichenden Ergebnissen kam.

Eibl (1939, 1941) hatte *Micrasterias rotata* zentrifugiert und nach der Verlagerung der Chloroplasten die Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes beobachtet. Ihm war das höchst auffallende Phänomen der Chloroplastenkontraktion bei Vitalfärbung schon bekannt, jedoch war die Frage nach der Reversibilität dieser Kontraktion noch offen. Unter dieser Fragestellung, der Frage also, ob *Closterium lunula* imstande sei, die durch chemische oder mechanische Reize in der Zelle hervorgerufenen Veränderungen wieder rückgängig zu machen, wurden die folgenden Versuche durchgeführt. Die mechanische Reizung wurde analog zu Eibls (1939) Klopfversuchen durchgeführt.



Abb. 1. Plastidenkontraktion von *Closterium lunula* nach schwachem Klopfreiz.

Dabei wird, wie Kopetzky-Rechtperg (1954) schreibt (wie auch bei der Vitalfärbung), das „Cytoplasma gereizt und zur Kontraktion gebracht, und da es in Form von Platten und Zungen den Chloroplasten einschließt, auch dieser zum Rückzug gebracht — sekundär werden dann ... die abrundenden Kohäsionskräfte des Plastiden wirksam.“ Zum Unterschied zu dieser endogenen Kontraktion und der damit verbundenen Chloroplastenverlagerung wird bei der Zentrifugierung die Verlagerung durch direkt von außen wirksame Kräfte hervorgerufen.

Das Material, mit dem die Versuche durchgeführt wurden, brachte Assistent Dr. Url aus dem Tannermoor im Waldviertel ein. Es wurde im Pflanzenphysiologischen Institut weiterkultiviert. Wie Herr Obermed.-Rat Dr. Kopetzky-Rechtperg, der das Material prüfte, feststellte, war es zur Zeit der Versuche noch in einem tadellosen und für Vitalfärbungsstudien durchaus geeigneten Zustand.

Als Farbstoffe wurden Neutralrot, Acridinorange, Brillantkresylblau und Rhodamin B verwendet.

1. Wirkung der Zentrifugierung

Mit diesen Versuchen wurde sehr vorsichtig begonnen, da *Closterium lunula* als empfindliches Objekt bekannt ist. Zuerst wurde eine Probe des angegebenen Materials bei 3000 U/min und $r = 140$ mm nur 5 Minuten lang zentrifugiert. Als die Zellen daraufhin noch keine Reaktion zeigten,

wurde die Probe unter denselben Bedingungen 10 Minuten weiterbehandelt. Auch jetzt war die Verlagerung der Chloroplasten noch gering. Der Abstand zwischen Zellwand und Chloroplast betrug bei seitlicher Verlagerung maximal ein Viertel der Zellbreite. Bei etwa 50% der Zellen war jedoch noch nichts von einer Verschiebung der Chloroplasten zu bemerken. Auffallend war, daß auch bei diesen Zellen wie bei jenen, die schon eine deutliche Reaktion auf das Zentrifugieren zeigten, die Protoplasmaströmung stark beschleunigt wurde. Die im Material als willkommene Vergleichsobjekte vorhandenen *Micrasterien* der Spezies *M. rotata* und *M. truncata* waren alle viel stärker geschädigt als *Cl. lunula* und in der Folge auch nicht imstande, ihre Chloroplasten in derselben Zeit wie *Cl. lunula* zurückzuverlagern.

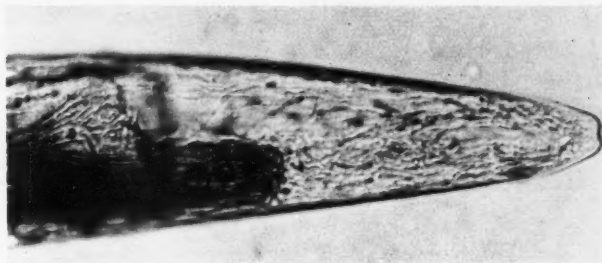


Abb. 2. *Closterium lunula*, vor zwei Stunden zentrifugiert. Die Spitze des in der Längsrichtung verlagerten Chloroplasten wandert bereits zurück. Lebhaftes Plasmaströmung. Zarte Plasmastränge ziehen zu den einzelnen Zacken der Chloroplastenrippen. Endvakuole geplatzt.

Wenn eine Chloroplastenverlagerung eingetreten war, so hatte sich der Chloroplast mit ganz wenigen Ausnahmen immer in seiner ganzen Länge von einer Seite der Zellwand abgelöst und zeigte eine klare, sägeartige Kontur.

Das Material wurde sofort nach dem Zentrifugieren in Standortswasser gebracht. Nach 5 Stunden bot die überwiegende Mehrzahl der Zellen, nach 7 Stunden boten praktisch alle ein vollkommen normales Bild. Die Chloroplasten waren zurückverlagert worden, und nur eine leichte Verkrümmung der Chloroplastenrippen deutete noch auf die vorangegangene Störung hin. Die Protoplasmaströmung war wieder normal. Bei den *Micrasterien* hatte die Rückverlagerung noch gar nicht begonnen.

Bei einer Zentrifugierung mit 3000 U/min, die 50 Minuten dauerte, waren die Schäden in den Zellen ungleich größer als beim vorher beschriebenen Versuch. Eine Chloroplastenverlagerung war nun in etwa 90% der Fälle eingetreten. Vor allem war nun häufig auch eine Verlagerung in der Längsrichtung zu bemerken (Abb. 2), der die Zelle anscheinend einen viel größeren Widerstand entgegengesetzt als der Verschiebung in seitlicher Richtung, da beim ersten Versuch kein einziger derartiger Fall aufgetreten war.

Bei dieser Längsverlagerung waren die Chloroplastenhälften teilweise heftig gegeneinandergepreßt, ja sogar seitlich übereinandergeschoben. Eine Endvakuole war in solchen Fällen immer geplatzt, und die Gipskriställchen waren in der Richtung der Zentrifugalkraft zum anderen Zellpol verlagert (Abb. 3). Bei solch starken Deformierungen war die Plasmaströmung allgemein beschleunigt, wenn auch zuweilen wirr durcheinanderlaufend und unregelmäßig die Richtung wechselnd. Bei starker Vergrößerung wurden nun äußerst zarte Plasmafäden sichtbar, die die Verbindung zwischen dem verschobenen Chloroplastenende und dem Wandplasma herstellten. Eine Strömung war an diesen Fäden nicht zu beobachten. Nach 24stündiger Wässerung (Standortswasser) waren von 56 untersuchten Exemplaren 48 vollkommen wiederhergestellt, bei 6 Zellen war der Chloroplast

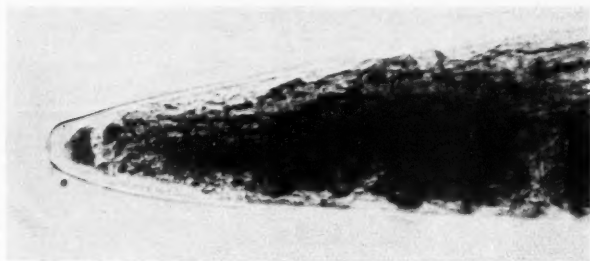


Abb. 3. Dieselbe Zelle wie in Abb. 2. Die zentrifugal verlagerten Gipskristalle im Zellpol angehäuft.

noch leicht verschoben (in solchen Fällen war auch die Plasmaströmung noch stärker), nur 2 waren tot.

Von den *Micrasterien* zeigten etwa 50% letale Schädigungen, bei allen anderen war die Chloroplastenverlagerung noch genau so stark wie unmittelbar nach dem Zentrifugieren.

Das heißt also, daß sich *Cl. lunula* gegen die mechanische Beanspruchung viel widerstandsfähiger zeigt als etwa die als härter beschriebenen *Micrasterien*. Regelmäßig ist eine überraschend schnelle Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes zu beobachten.

Klopfen

Nach Eibl (1939) wird eine *Micrasterias*-Zelle durch einen leichten, rhythmischen Klopfreiz zu einer Chloroplastenkontraktion veranlaßt. Es lag nun nahe, auch *Cl. lunula* auf seine Reaktion diesem Reiz gegenüber zu untersuchen.

Bringt man eine Probe von *Cl. lunula* unter ein Deckglas und klopft mit einer Pipette leicht auf das Deckglas, so setzt augenblicklich eine Chloroplastenkontraktion ein, jedoch nicht etwa so, wie bei der Behandlung mit Vitalfarbstoffen, bei der sich der Chloroplast oft konkav einbuchtet. Er zieht sich vielmehr ziemlich gleichmäßig von der Zellwand zurück (Abb. 4), ohne

seine wellige Kontur zu verlieren. Die Abhebung beginnt in den meisten Fällen am Zelläquator und setzt sich dann gegen die Pole zu fort. Das Klopfen braucht jedoch durchaus nicht rhythmisch zu sein (Eibl 1939), vielmehr reagiert die Zelle auf betont arhythmisches Klopfen in genau derselben Weise.

Als Beispiel sei ein Versuchsprotokoll angegeben:

9. XII. 1959, 14^h40: *Cl. lunula* wird durch leichtes Klopfen gereizt. Nach wenigen Sekunden schon beginnt die Chloroplastenkontraktion. Da die Kontraktion auf der einen Zellseite am Zelläquator, auf der anderen Seite jedoch an zwei Stellen beginnt, bekommt der Chloroplast eine leicht gewundene Form. Fast gleichzeitig wird auch die Plasmaströmung schneller.

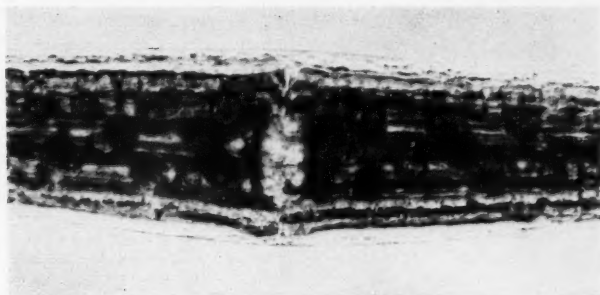


Abb. 4. *Closterium lunula* unmittelbar nach leichtem Klopfreiz. Beide Chloroplastenhälften kontrahieren sich und heben sich in ihrer ganzen Länge von der Zellwand ab.

15^h35: Die Kontraktion hat noch zugenommen. Plasmaströmung gleich stark.

16^h07: Gleicher Zustand.

16^h20: Die Strömung verlangsamt sich, der Chloroplast dehnt sich deutlich wieder aus. Es bietet sich fast dasselbe Bild wie unmittelbar nach der Reizung.

18^h10: Der Chloroplast hat seine frühere Form wieder angenommen, die Plasmaströmung ist vielleicht noch ein bißchen schneller als vor der Kontraktion. Auf neuerliches Klopfen reagiert die Zelle nicht.

Während des ganzen Versuches wurde ein und dieselbe Zelle beobachtet, jedoch zeigten sich auch an anderen Zellen mit unbedeutenden zeitlichen Verschiebungen gleiche oder sehr ähnliche Erscheinungen.

Alle beobachteten Fälle von Chloroplastenkontraktion, die durch Klopfen hervorgerufen wurden, waren reversibel.

2. Vitalfärbung

Ebenso wie auf einen mechanischen Reiz reagiert *Cl. lunula* auch auf Vitalfarbstoffe vorzugsweise mit einer Kontraktion der Chloroplasten. Sehr häufig tritt dazu noch eine Vakuolenkontraktion. Es treten aber zum Unterschied zur vorher beschriebenen Chloroplastenkontraktion, bei der sich der Chloroplast meist in seiner ganzen Länge zusammenzieht, hier k o n k a v e

Einbuchtungen auf, die zweifellos auf eine viel stärkere Schädigung der Zellen hinweisen. In krassen Fällen ist die Zelle sogar nicht mehr imstande, den Schaden wieder gut zu machen.

Man kann sagen, daß diese konkaven Einbuchtungen am Chloroplasten um so häufiger auftreten, je schädlicher bzw. konzentrierter der verwendete Farbstoff ist.

Bei vergleichenden Versuchen mit Brillantkresylblau, Neutralrot und Acridinorange nahm die Häufigkeit der konkaven Einbuchtungen und der irreversiblen Schädigungen in der angeführten Reihenfolge der Farbstoffe zu. Allerdings muß betont werden, daß nach Neutralrotfärbung in einzelnen Fällen eine Entfärbung in Standortswasser einfach nicht mehr möglich ist, während die Entfärbung normalerweise verhältnismäßig rasch vonstatten geht. In solchen Zellen blieb sowohl die Chloroplasten- als auch die Vakuolenkontraktion erhalten, der Chloroplast blieb zu einem blassen Gelbgrün aus, und die Zelle starb schließlich ab.

Immer wieder waren bei den Versuchen einige Ausnahmefälle zu beobachten. Es kann zum Beispiel vorkommen, daß nach einer 30 Minuten dauernden Färbung mit Neutralrot 1 : 10.000 alle Vakuolen angefärbt und kontrahiert sind, und nur eine einzige Zelle, die genau denselben Bedingungen unterworfen ist, zeigt weder eine Färbung noch irgendeine andere der typischen Reaktionen auf den Farbstoff (vgl. Kiermayer 1954).

Die Färbungsstudien wurden durchgeführt mit:

1. Neutralrot (Heilmittelwerke): Die Stammlösung (1 : 1000) wurde in Aqua dest. (pH um 5,5) hergestellt, die Verdünnung auf 1 : 5000 und 1 : 10.000 mit Wiener Leitungswasser durchgeführt (pH ca. 7,8). Das gilt auch für alle folgenden Farbstoffe. Pufferlösungen wurden nicht verwendet. (Nach Hofmeister, 1948, sind Pufferlösungen unter Umständen nicht physiologisch indifferent!)

Neutralrot ist ein basischer Vitalfarbstoff. Es gilt als einer der unschädlichsten Farbstoffe (Cholnoky und Höfler 1950, Kiermayer 1954, Höfler und Schindler 1955, E. Huber 1955). Auf gewisse Objekte, wie z. B. *Spirogyra* (E. Huber 1955) hat es jedoch einen schädigenden Einfluß. Man kann Neutralrot auch zur Unterscheidung von vollen und leeren Zellsäften (Höfler 1949, Wiesner 1951) heranziehen. Die vollen Zellsäfte färben sich violettrot, die leeren ziegelrot an.

2. Acridinorange (Bayer-Leverkusen): 1 : 5000, 1 : 10.000. Dieser Fluoreszenzfarbstoff dient schon in der Hellfelduntersuchung zur Unterscheidung von vollen und leeren Zellsäften (Höfler 1947, Höfler und Schindler 1955), wobei sich die leeren Zellsäfte gelb anfärben, während die vollen ungefärbt bleiben. Viel krasser zeigt sich der Unterschied jedoch im Fluoreszenzmikroskop: die leeren Zellsäfte zeigen eine kupferrote, die vollen eine grüne Farbe.

3. Brillantkresylblau (Grübler): 1 : 5000, 1 : 10.000. Dieser Oxazinfarbstoff mit einem Umschlagpunkt von über pH 8 wird wegen seiner Unschädlichkeit viel verwendet (Loub 1951, Kinzel 1954, Höfler und Schindler 1955, E. Huber 1955, Flasch 1956, Drawert 1956).

Nach Höfler und Diskus (1957) färben sich leere Algenzellsäfte mit BKB violett an. Eventuelle Blaufärbungen werden auf Verunreinigungen durch Nilblau (Höfler und Diskus 1957, nach Drawert und Metzner 1956, 390) zurückgeführt. So erklärt sich wohl auch der blauviolette Farbton, in dem sich die leeren Zellsäfte von *Cl. lunula* anfärbten.

In einem Parallelversuch mit allen drei bisher angeführten Farbstoffen (1:10.000) wurden die Färbungszeiten variiert.

4. Rhodamin B (Merck): 1:1000, 1:10.000. Das elektroneutrale Rhodamin B, das im gesamten biologischen pH-Bereich in undissoziierter Form vorliegt, wird von Strugger als der unschädlichste Vitalfarbstoff überhaupt bezeichnet. Durch Rhodamin B werden nur volle Zellsäfte tingiert, während leere, die sich sonst nach dem Ionenfallenprinzip anfärben, ungefärbt bleiben. Eventuelle Färbungen leerer Zellsäfte könnten auf Grund von schweren Schädigungen zustande kommen.

Bei *Micrasterias rotata* unterscheidet Eibl (1939 a) einige Formen der Chloroplastenkontraktion.

Analog konnte ich bei *Cl. lunula* verschiedene Typen der durch Vitalfarbstoffe hervorgerufenen Chloroplastenkontraktion beobachten:

Die Kontraktion kann sich auf die in der Zellmitte gelegenen Chromatophorenspitzen beschränken, wodurch die beiden Chloroplastenhälften auseinandergezogen werden (Abb. 9). Der am häufigsten vorkommende Typus besteht in Einbuchtungen an der Chloroplastenseite, wodurch die Rippen verzogen werden, so daß der Chloroplast schließlich gewunden erscheint (Abb. 7).

* Die Kontraktion erfolgt am Anfang in schnellem Tempo und stagniert, wenn der Chloroplast nur mehr etwa drei Viertel seiner ursprünglichen Breite besitzt. Wird durch neuerliche Zugabe z. B. von Acridinorange noch eine weitere Kontraktion erzwungen, so ist das Todesurteil über die Zelle gesprochen. Entweder koaguliert das Plasma sofort und der Chloroplast schrumpft binnen kurzer Zeit zu einer schwärzlichen Masse zusammen oder die Zelle ist zumindest nicht mehr imstande, die Kontraktion rückgängig zu machen. Eine dritte, bei der Behandlung mit Vitalfarbstoffen jedoch seltener auftretende Form der Kontraktion ist ein gleichmäßiges Zusammenziehen einer Chromatophorenhälfte oder auch beider, die dann auch in kontrahiertem Zustand seitlich geradlinig begrenzt sind (Abb. 8).

Die wellige Kontur geht bei der Beeinflussung durch Farbstoffe meist verloren.

Die Reversibilität der Chloroplastenkontraktion steht deutlich mit der Färbungsdauer in Verbindung. Unter Umständen können an Zellen, die mit Acridinorange 1:10.000 10 Minuten und solchen, die 30 Minuten eingefärbt wurden, genau dieselben Erscheinungen, die auch graduell kaum verschieden sein müssen, beobachtet werden. Nachher geht aber die Kontraktion nur bei dem Material zurück, das 10 Minuten eingefärbt wurde.

Die häufig auftretende Vakuolenkontraktion (Abb. 5) weist darauf hin, daß es sich bei *Cl. lunula* um leere Zellsäfte handelt. Also um solche, bei denen durch Zusatz von NH_3 eine Entfärbung erreicht werden kann. (Nach Höfler 1949.) Tatsächlich wurden die Vakuolen bei Acridinorangebehandlung gelb tingiert (Hellfeld), was das Vorhandensein leerer Zellsäfte beweist.

Im folgenden sollen die Vitalfärbungsversuche einzeln besprochen werden.

Färbung mit Neutralrot

Allgemeine Erscheinungen

Die Anfärbung des Zellsaftes beginnt normalerweise nach wenigen Minuten. Es wurde sowohl Diffusfärbung (rosa bis dunkelrot je nach Färbungsdauer und Farbstoffkonzentration), als auch Tröpfchen-

speicherung beobachtet. Wenn in der Endvakuole Entmischungskugeln entstehen, so lagern sich die Gipskriställchen in regelmäßiger Weise wie Strahlen daran an (ähnlich bei Brillantresylblau).

Gleichzeitig mit der Zellsaftfärbung setzt eine Verlangsamung der Plasmaströmung ein. Die Vakuole wird, da das Plasma leicht verquillt, kleiner. Besonders schön ist diese Kontraktion an der Endvakuole zu beobachten

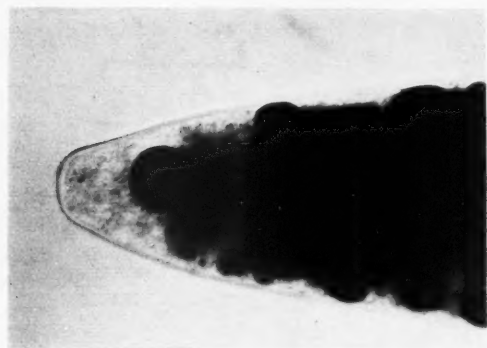


Abb. 5. Neutralrotfärbung: Diffusfärbung und Kontraktion der Endvakuole. Plasma verquollen. (Chloroplast von der Zellwand abgehoben.)

ten (Abb. 5), deren Färbung durch das Zusammenziehen intensiver und dunkler wird.

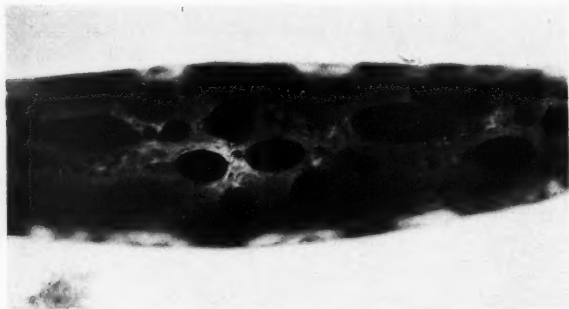


Abb. 6. Neutralrotfärbung: Anfärbung und Kontraktion der Wabenvakuolen.

Die Chloroplastenkontraktion beginnt meist am Zelläquator. Normales Bild: langgestreckte Einbuchtungen, eingezogene Ecken, seltener stark konkave Einbuchtungen. Bei Überfärbung bleicht der Chloroplast erst aus und schrumpft dann vollständig zusammen.

Überführt man die Zelle bald genug in Standortswasser, so sind alle die

angeführten Erscheinungen reversibel. Am längsten dauert es, bis sich die Entmischungskugeln aufgelöst haben.

Eine unterschiedliche Anfärbung (Metachromasie) verschiedener Vakuolen konnte nicht beobachtet werden (vgl. Kiermayer 1954). Jedoch ging die Anfärbung in derselben Weise vor sich, wie es Cholnoky und Höfler (1950) beschrieben (Neutralrotfärbung von *Cl. libellula*): zuerst Anfärbung der End-, dann der Hauptvakuolen, Kontraktion, Zerteilung und schließlich Abrundung der Teilvakuolen (Abb. 6). Die Vakuolenkontraktion betraf auch die Endvakuolen (vgl. Kiermayer 1954).

Acridinorange

Dieser Farbstoff wirkt schädigender als Neutralrot. Zum Beispiel wird eine Farbstoffkonzentration von 1 : 5000 auch bei kurzer Färbungsdauer nur von ganz wenigen Exemplaren ertragen. Es kann sowohl Diffusfär-



Abb. 7. Acridinorangeanfärbung: Zelle irreversibel und letal geschädigt.

bung wie auch Tröpfchen- und Krümelspeicherung (alle drei Typen nebeneinander) auftreten. Normalerweise bilden sich zuerst Entmischungskugeln, nach einigen Minuten kommt die gelbe Diffusfärbung des Zellsaftes dazu, und erst im Verlauf der Wässerung tritt auch die Krümelspeicherung auf. Unter Umständen ist aber auch eine andere Reihenfolge möglich. Hinsichtlich der Plasmaströmung und der Vakuolenkontraktion ergab sich dasselbe wie bei Neutralrot.

Die Chloroplastenkontraktion tritt schneller ein. Typisch sind starke Dellen, die Rippen sind sehr stark verzogen (Abb. 7). Nur selten zieht sich der Chloroplast unter Beibehaltung der früheren Form zusammen. Entsprechend schwieriger ist die Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes. Die Möglichkeit dazu ist aber bei nicht allzu starker Beschädigung durchaus gegeben. Auch hier erhalten sich die Entmischungskugeln bei der Wässerung am längsten.

Versuch vom 10. November 1959: Material: *Cl. lunula* (WTa 59).

13^h 53: Einfärbung in Acridinorange 1 : 10.000.

14^h: Es ist noch keine Zellsaftdiffusfärbung zu sehen. In den Endvakuolen sind jedoch schon Entmischungskugeln vorhanden, die sich in lebhafter BMB befinden. Das Plasma strömt viel langsamer als vor Beginn der Färbung. Die Chloroplastenkontraktion tritt schon sehr deutlich in Erscheinung. Die Hauptvakuole ist vielfach

zerteilt. Jede Teilvakuole entspricht einer Einbuchtung des wellenschliffartig profilierten Chloroplasten.

14^h 05: Langsam beginnt die Zellsaftdiffusfärbung. Es scheint ein gewisser Unterschied im Farbton zwischen End- und Hauptvakuolen zu bestehen (Hauptvakuolen heller).

14^h 07: Zur Chloroplastenkontraktion kommt nun eine sehr deutliche allgemeine Vakuolenkontraktion. Die Zellsaftfärbung ist noch schwach.

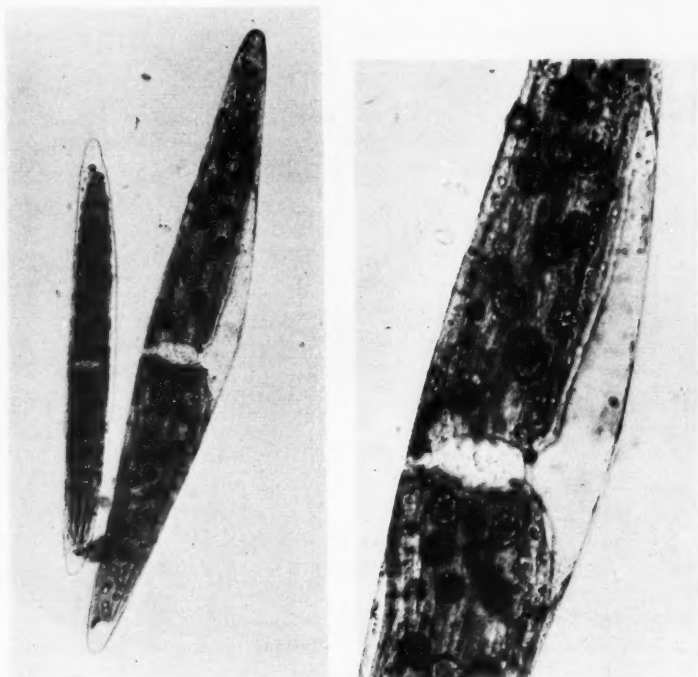


Abb. 8. Brillantkresylblaufärbung: a) Übersichtsbild (*Cl. lunula* und *Cl. sp.*), b) *Cl. lunula*: langgestreckte Einbuchtung. Links unten schwache beginnende Dellenbildung. Starkes Hervortreten der Pyrenoide.

15^h 05: End- und Hauptvakuolen sind im selben Farbton sattgelb diffus tingiert. Chloroplastenkontraktion allgemein vorhanden.

Die Behandlung mit Acridinorange hat sowohl bei einer Konzentration von 1 : 10.000 wie bei der von 1 : 5000 im Endeffekt dasselbe Bild ergeben: eine sattgelbe Diffusfärbung der Zellsäfte. Das beweist, daß der Zellsaft von *Cl. lunula* leer ist. Das Ergebnis entspricht auch der Theorie, daß Vakuolenkontraktion nur bei leeren Zellsäften eintreten könne. Tatsächlich tritt ja sowohl bei der Behandlung mit Neutralrot wie auch bei der Färbung mit Acridinorange eine deutliche und reversible Vakuolenkontraktion auf.

Brillantkresylblau

Alle oben erwähnten Erscheinungen finden sich auch bei der Färbung mit Brillantkresylblau wieder. Jedoch treten sie schneller in Erscheinung und sind auch schneller rückgängig zu machen. In der Wirkung steht Brillantkresylblau dem Neutralrot nahe (Abb. 8), scheint für *Cl. lunula* aber noch weniger schädlich zu sein (vgl. E. Huber 1955, Flasch 1956). Der Zellsaft weist nach der Färbung (Diffusfärbung und Entmischungskugeln) einen Farbton auf, der als Blauviolett bezeichnet werden könnte, dem Violett jedoch näher steht (vgl. Höfler und Diskus 1956, E. Huber 1955).

Eine Vakuolenkontraktion stellt sich seltener ein, als bei Neutralrot und Acridinorange. Membran und Schleimhülle färben sich schlagartig an und entfärben sich ebenso schnell bei der Wässerung.

Versuch vom 20. November 1959:

14^h 51: Der Probe wird ein Tropfen Brillantkresylblau 1 : 10.000 zugesetzt.

14^h 53: Auflegen des Deckglases.

14^h 54: Schleimhülle und Membran sind dunkelblau angefärbt, der Zellsaft blaßviolett. Es sind zahlreiche Entmischungskugeln (3–6 μ dick), vorhanden. Plasmaströmung unverändert.

14^h 58: Chloroplastenkontraktion: Meist in der ganzen Länge kontrahiert, seltener Dellen. Erscheinungsbild ähnlich wie bei Neutralrot. Plasmaströmung überall deutlich verlangsamt. Vakuolenkontraktion ziemlich häufig, jedoch nicht allgemein.

15^h 11: Zellsaft dunkelblauviolett. Die Plasmaströmung stärker verlangsamt. Keine stärkere Chloroplastenkontraktion.

15^h 13: Derselbe Zustand. Die Chloroplastenkontraktion schwächer als sie unter denselben Bedingungen bei Neutralrot ist. Die Hauptvakuolenteile sind etwas dunkler gefärbt als die Endvakuolen.

15^h 22: Derselbe Zustand. Wässerung in Standortswasser.

21. November 1959:

15^h 20: Alle Zellen sind vollkommen entfärbt und restituiert. An keiner einzigen ist irgend eine bleibende Schädigung zu bemerken.

Rhodamin B

Eine 10 Minuten dauernde Färbung mit der bei diesem Farbstoff oft angewandten Konzentration von 1 : 1000 führte bei allen Zellen zum Absterben. Bei einer Konzentration von 1 : 5000 ergab sich ein im wesentlichen analoges Bild zu den bisher besprochenen Farbstoffen. Einige kleine Unterschiede waren aber doch zu bemerken: Der Chloroplast kontrahiert sich vorzugsweise in der Längsrichtung (Abb. 9), bevor noch die Dellen auftreten. Der Zellsaft färbt sich nicht an (Flasch 1956, 610). Die wellige Kontur des Chloroplasten geht meist nicht verloren. Bei etwa 70% der Zellen konnte nach zehnminütiger Färbung mit Rhodamin B 1 : 5000 und nachfolgender 24stündiger Wässerung der ursprüngliche Zustand wiederhergestellt werden. 30% waren teils schon tot, teils befanden sie sich in einem nekrotischen Zustand.

Schließlich sei noch ein Parallelversuch mit Neutralrot, Acridinorange und Brillantkresylblau wiedergegeben, bei dem die Konzentration

aller Farbstoffe einheitlich 1 : 10.000 betrug, während die Färbungszeiten zwischen 10 und 60 Minuten variiert wurden. Nach Rückübertragung in Standortswasser wurde in Abständen von 24 Stunden beobachtet (Tab. 1).

Zusammenfassung

Die bevorzugte Reaktion der Desmidiacee *Cl. lunula* auf Reize der verschiedensten Art ist eine Chloroplastenkontraktion. Weiters kann die Zelle durch Vakuolenkontraktion, Vakuolenzerteilung, Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit des Plasmas, abnormes Verhalten der Gipskriställchen in den Endvakuolen, Ausbleichen des Chromatophors oder

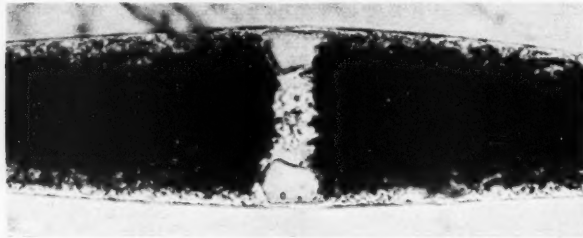


Abb. 9. Rhodamin-B-Färbung: Chloroplast längs kontrahiert. In der Zellmitte auseinandergezogen.

starkes Hervortreten der Pyrenoide reagieren. Prinzipiell ist *Chlosterium lunula* imstande, alle diese Veränderungen rückgängig zu machen. Es zeigte sich aber, daß die durch Farbstoffe hervorgerufene Kontraktion viel weniger harmlos ist als jene, die nach einer mechanischen Reizung auftritt. Auch nach starker Zentrifugierung war nur ein ganz geringer Prozentsatz der Zellen nicht mehr imstande, die Verlagerung rückgängig zu machen.

Die vor allem auftretende Kontraktion der Chloroplasten wird je nach der Art des Reizes und der Stärke der Schädigung verschieden durchgeführt: so war bei leichten mechanischen Reizen eine Kontraktion in der ganzen Länge des Chloroplasten festzustellen, der also auch nach dem Zusammenziehen seine ursprüngliche Form bewahrt hatte. Diese Kontraktionsform trat auch bei Färbung mit den unschädlicheren Farbstoffen (Brillantkresylblau und Neutralrot) noch auf, während bei stärkerer Schädigung die Häufigkeit der Kontraktion in Form von konkaven Einbuchtungen und Dellen zunahm. Ist der Chloroplast über eine gewisse Grenze hinaus, die sich mit etwa ein Viertel bis maximal ein Drittel seiner eigenen Breite angeben läßt, kontrahiert, so geht die Reversibilität verloren. Im Verlauf der Untersuchungen ergab sich (vor allem bei der Acridinorange-Färbung), daß *Cl. lunula* leere Zellsäfte hat. Ein metachromatischer Unterschied zwischen End- und Wabenvakuolen war nicht zu bemerken. Entsprechend dieser Zellsaftbeschaffenheit war bei der Vitalfärbung Vakuolenkontraktion zu erwarten. Diese konnte auch tatsächlich häufig festgestellt werden. Als unschädlichster der verwendeten Vitalfarbstoffe erwies sich für *Cl. lunula*

Tabelle 1.

Farbstoff	Neutralrot			Acridinorange			Brilliantcresylblau		
Färbungs- dauer	10'	30'	60'	10'	30'	60'	10'	30'	60'
Befund nach der Färbung	Zellaft schwach rosa. Bei etwa der Hälfte schon schwache Chloro- proplatenkontr. Sehr viele Ent- mischungskgl. Auch schon Va- kuolenkontr.	Zs. dunkelrot. Viele Entmkg. Chlpl. n. stark (70% der Zellen), fast nie konkav. Farbst.ausgefäll. Str.etwas langsa- mer. Allgemein VK.	Tiefdunkelr. Zs. Entm.-K. 6—8 µ. Allg. VK. Plstr. stark verlangs. Chlpl. n. stär- ker als b. 30', aber alle ausgebleicht. Farbst.ausgefäll. Dellen häufig	Starke, meist konkave Kontr. der Chlpl. ist Regel. Zellaft schwach gelb, we- niger Entmkg. als bei NR. 20% zel- len VK. Plstr. verlangsam	Chlpl. stärker. Diffus u. Entmkg. (4-6 µ). Einige le- tal geschädigt. 60% VK. Chlpl. ganz allgemein, meist konkav Plstr. langsamer, P. verquollen	Allg. starke konk. Chlpl. 20% d. z. tot. Zs. sattgelb. Entmkg. 1—5 µ. Gipskrist. konglo- merisiert. Rip- pen ausgebleicht u. stark verzogen. Plstr. ganz lang.	80% weis. Chlpl. auf, jedoch nur selten konk. VK. zieml. häufig (bei etwa 30%) Pl. u. Zs. blauviolett. Rippen sind etw. verzogen. Plstr. leicht verlangs.	EV. dunkler ge- färbt als SV. Entmkg. 9-12 µ. u. viele kleine Vak. stark zerteilt. Allgem. starke Chlpl. Plstr. sehr stark verlang- sam, 5 % tot	Chlpl. allgemein und stärker. Del- ten öfter auftre- tend. 10% tot. Plstr. manchmal bis z. Stillstand verlangsam. Entmkg. 3—5 µ

WÄSSERUNG IM STANDORTWASSER

Nach 24 Stunden	VK. hat zuge- nommen. Plastr. leicht verlang- sam. Zs. noch immer schwach rosa. Chlpl. nicht zurückge- gangen. Alle le- ben	Zs. dunkelrot. Chlpl. gleichge- gangen, aber die VK. sind zurückge- gangen. Die Chlpl.-Rippen sind verzogen. Str. langsam	Zs. gleich stark angefärbt. 20% Entm. größer geworden. Die Chlpl. sind stark geschädigt. Chlpl. bleich	Bisa. d. Entm. K. vollständige Ent- färbung. Die Chlpl. ist noch gleich stark. Keine VK. mehr. Plastr. wieder nor- mal	Färbung: diffus + Entm. + Krimel. Chlpl. aufgebläht. Ge- gang. Pl. strömt fast nicht mehr. VK. scheint zu- rückgez. zu sein. Etwa 10% tot	Schwerste Schä- digung. 30% tot. Maßmal. Vak. hinausgetrieben. entfärbt. Chlpl.- Struktur häufig zerstört, aber noch langa. Plastr. kein. ungeschäd.	Vollkomm. ent- färbt u. resti- tuiert, bis auf leichte Verzie- hung der Rippen starkes Hervor- treten d. Zacken. Plastr. wieder normal	Entfärbt bis auf wenige Entm. K. aufgebläht. Ge- gang. Pl. strömt nicht mehr. Nur wenig. Chlpl. ge- stark. Plastr. wie- der normal. 5-10% tot.	Totalentfärbg. Aber meist noch starke Chlpl. aufgebläht. Ge- gang. Pl. strömt nicht mehr. Nur wenig. Chlpl. ge- stark. Plastr. wie- der normal. 5-10% tot.
	Entfärbt. Plastr. normal. Keine Vakuenkon- traktion zu beob- achten. Jedoch schwache Chlpl. Alle leben	Keine Entm.- Kgl. aber gl. stk. Diffusbg. Chlpl. ausgebleicht und Vak.-Kontr. voll- ständig. Zurück- abged. Plastr. aber d. Pl. strömt noch langsamer	50% der Zellen sind tot. Bei den lebenden VK. zurückgegangen. Der Plastr. ganz noch gefärbt. Alle Chloroplast. von bräunlich. Farbe	Vollkomm. ent- färbt. Etwa 5% d. Zellen sind tot, alle anderen aber vollkomm. abged. Plastr. Die Plastr. scheint etwas schneller als norm. zu sein	Der Zustand ent- spricht dem nach 24 Stunden, aber Zellen sind sich immer mehr Plastr. kann noch merkbar. Viele Krimel	80% der Zellen sind tot. Bei den noch leb. Plastr. kaum noch zu be- merken. Das Pl. schleichen d. Zellen vor der Färbung diffus, aber hart- näck. Entm. K.	Vollkomm. ent- färbt. Aber nun etwa 20% abge- storben. Die an- deren sind bis auf leichte Ver- ziehung der Rip- pen wiederher- gestellt	70% sind tot. Der Zustand ist nur bei 2 von 25 wie- derhergestellt. Bei wieder normal. währ. bei d. fibr. kaum zu bemerk.	Fast alle sind ab- gestorben. Die ganz wenigen al- terdings, die le- ben, 3 unter 34, sind bis auf die leichte Verzie- hung der Rippen voll restituiert
	Nach 72 Stunden	Sämtliche Zellen sind total ent- färbt und resti- tuiert. Sie befin- den sich in dem selben Zustand wie vor der Fä- rbung	90% der Zellen sind tot. Alle anderen scheinen zumindest nicht mehr in ständi- gen Schädigun- gen rückgängig zu machen	Bis auf wenige d. sich aber auch in einem nekro- tischen Zustand befinden, sind nun alle Zellen tot. Die Färbung ist nicht zu lange gedauert	Nur noch leicht entm. aber Krimel. Bei d. n. lebend. 30% ist d. Chlpl. n. gleich stark u. ausget- tot. Die Chlpl. bei. Keine Plastr.	Alle Zellen voll- tot. Nur bei einer einzeligen unter 37 Ein Vergleichen m. friechen Material zeigt keine Un- terschiede	Alle Zellen voll- komm. entfärbt und restituiert. Bei Vergleich mit frischem Material zeigt keine Un- terschiede	Fast alle sind ab- gestorben. Die ganz wenigen al- terdings, die le- ben, 3 unter 34, sind bis auf die leichte Verzie- hung der Rippen voll restituiert	

Abkürzungen zu Tab. 1: Zs. = Zellaft, Chlpl. = Chloroplast, Chlpl. = Chloroplastkontraktion, Str. = Plasmaströmung, VK. = Vakuolenkontraktion, Pl. = Plasma, Entm. = Entmischungskugeln, EV. = Endvakuolen, SV. = Seitenvakuolen

Brillantkresylblau. Als schädlichster Acridinorange. Rhodamin B und Neutralrot liegen dazwischen, wobei die Häufigkeit der letalen Schädigungen normalerweise bei Rhodamin B-Behandlung größer ist, während die Restitution nach Neutralrotfärbung langsamer vor sich geht.

Es sei mir gestattet, Herrn Professor Dr. Karl Höfler, dem Vorstand des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien, dessen Rat und Unterstützung das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglichte, meinen ergebenen Dank auszusprechen.

Literatur

- Cholnoky, B. v., und K. Höfler, 1950: Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 159, 145.
- Dangeard, P., 1947: Cytologie végétale et cytologie générale. Paris.
- Drawert, H., 1938: Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Ber. dtsch. bot. Ges. 56, 123.
- 1948: Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturforsch., Bd. 3 b, 111.
- 1956: Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. Handbuch der Pflanzenphysiologie, herausgegeben von W. Ruhland, Band II, Allgemeine Physiologie der Pflanzenzelle. Berlin-Heidelberg-Göttingen.
- und I. Metzner, 1955: Vitalfluorochromierungen mit Brillantkresylblaupräparaten verschiedener Herkunft. Ber. dtsch. bot. Ges. 68, 385.
- Eibl, K., 1939 a: Kontraktion der Chromatophoren bei *Micrasterias rotata*. Protoplasma 32, 251.
- 1939 b: Studien über das Plasmolyseverhalten der Desmidiaceen-Chromatophoren. Protoplasma 33, 531.
- 1941: Die Restitution der Chromatophorenform bei *Micrasterias rotata* nach Schleuderungen. Protoplasma 35, 555.
- Flasch, A., 1955: Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen. Protoplasma 44, 412.
- 1956: Die Festigkeit einiger basischer Farbstoffe in vitalgefärbten Pflanzenzellen. Protoplasma 45, 595.
- Franz, R., 1958: Lipidentmischung von Algenplastiden. Protoplasma 49, 197.
- Guilliermond, A., 1930: Sur la toxicité des colorants vitaux. Extrait des Comptes rendus des séances de la Société de biologie. Séance 1930. Tome CIV, page 468.
- 1927: Sur l'action du Rouge Neutre sur les Cellules Végétales et sur la Coloration du Vacuome. Bull. d'Histol. appl. IV/4 (Labor. Botanique, Fac. des Sciences de Paris).
- et R. Gautheret, 1938 b: Observations sur l'action de divers colorants sur les cellules végétales vivantes. C. r. acad. sci., Paris 206, 1517.
- Hirn, I., 1953: Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen. Flora 140, 455.
- Höfler, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
- 1949 a: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biologia gen. 19, 90.
- 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., I. Abt., 156, 585.
- 1949 b: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie, 1. Sonderber. Z. Mikrosk. 46.
- 1953: Zur Vital- und Fluoreszenzfärbung. Ber. dtsch. bot. Ges. 46, 10, 453.

- Höfler, K., und A. Diskus, 1957: Vitalfärbungen mit Nilblau und Brillantkresylblau. *Protoplasma* 48, 429.
- und H. Schindler, 1951: Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. *Protoplasma* 40, 137.
- 1953: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien. *Protoplasma* 42, 296.
- 1955: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. *Protoplasma* 45, 173.
- Hofmeister, L., 1958b: Studien über die Permeabilität vitalgefärbter Pflanzenzellen. I. Versuche mit Neutralrot und Methylenblau. *Z. wiss. Mikrosk.* 55, 395.
- Huber, E., 1955: Über den schädigenden Einfluß von Neutralrot auf *Spirogyra*-Zellen. *Protoplasma* 45, 491.
- 1955: Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen mit leeren und vollen Zellsäften. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 164, 909.
- Kiermayer, O., 1954: Die Vakuolen der Desmidiaceen, ihr Verhalten bei Vitalfärbe- und Zentrifugierungsversuchen. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 163, 176.
- Kinzel, H., 1955: pH-Werte alkalischer Phosphatpufferlösungen. *Protoplasma* 43, 441.
- 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. *Protoplasma* 44, 52.
- 1958: Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. *Protoplasma* 50, 1.
- Kopetzky-Rechtperg, O. v., 1951: Über die Kristalle in den Zellen der Gattung *Closterium* Nitzsch (Desmidiaceae). Beihefte Bot. Cbl. 47, 1. Abt., 291.
- 1949: Zellbau und Zelleinschlüsse bei Conjugaten, besonders Desmidiaceen. *Protoplasma* 39, 106.
- 1954: Beobachtungen an Protoplasma und Chloroplasten der Alge *Netrium digitus* (Ehrenberg) bei Kultur unter Lichtabschluß. *Protoplasma* 44, 322.
- Krebs, I., 1951: Beiträge zur Kenntnis der Desmidiaceen-Protoplasten. I. Osmotische Werte, II. Plastidenkonsistenz. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 160, 579.
- 1952: Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplasten. III. Permeabilität für Nichtleiter. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 161, 291.
- Krieger, W., 1955: Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außer-europäischen Arten. Rabenhorsts Kryptogamenflora 15, Abt. 1.
- Küster, E., 1951: Die Pflanzenzelle. Jena.
- Loub, W., 1951: Über die Resistenz verschiedener Algen gegen Vitalfarbstoffe. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 160, 10.
- Schindler, H., und W. Rücker, 1956: Resistenz und Nekrose von Pflanzenzellen nach Einwirkung des Insectizids Systox. *Protoplasma* 46, 619.
- Strugger, S., 1956: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 26, 56.
- 1940b: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 34, 601.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Berlin.
- Url, W., 1955: Resistenz von Desmidiaceen gegen Schwermetallsalze. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 146, 207.
- 1959: Vergleichende Untersuchungen über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen Natriumkarbonat. *Protoplasma* 51, 538.
- West, W., und G. S. West, 1904—1922: A Monograph of the British Desmidiaceae. Volume I, London.
- Wiesner, G., 1951: Untersuchungen über Vitalfärbung von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. *Protoplasma* 40, 405.

Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper

(I. Lichtmikroskopischer Befund)

Von

R. Jarosch

Biologische Forschungsabteilung der Österr. Stickstoffwerke AG (Leiter Prof. Dr. H. Linser) und Mikrobiologische Station der Stadt Linz (Leiter Prof. Ewald Schild)

Mit 27 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. März 1960)

Einleitung

Auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen ist heute schon klar zu sehen, daß die Struktur des Protoplasmas, sowie die seiner wesentlichen Inhaltskörper überall ähnliche Züge zeigt. Man kann daher mit *S i t t e* [30] sagen: „In je kleinere Bereiche die Forschung vorstößt, desto mehr beschränkt sich die Fülle der Formen, desto allgemeiner gilt auch jede Erkenntnis.“

Unabhängig vom allgemeinen Bauplan des Plasmas gibt es aber auch spezifische Inhaltskörper und vor allem eine Spezifität des funktionellen Verhaltens. Vielleicht wird diese Spezifität in der Zukunft zumindest teilweise auf quantitative Verschiedenheiten des allgemeinen Bauplans zurückgeführt werden können. Vorläufig ist man in den meisten Fällen jedoch davon noch weit entfernt, und das Spezifische jeder Plasma-Gattung muß eigens festgestellt und beschrieben werden.

Die folgende Arbeit bringt eine zusammenfassende Beschreibung der lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturen und Inhaltskörper des *Characeen*-Plasmas. Entstehung und Funktion der einzelnen Körper sind nach Möglichkeit beschrieben und gedeutet.

Methodik

Das hier hauptsächlich von *Nitellopsis* (= *Tolypellopsis*) *stelligera* stammende Protoplasma wurde einerseits direkt in der Zelle beobachtet, oder aber in kompakten Tropfen außerhalb der Zelle — im Zellsaft liegend —

untersucht. Wenn man eine größere Internodialzelle mit Filterpapier gut abtrocknet, abschneidet und mit einer Pinzette ausquetscht, so findet man meistens in dem ausgepreßten Zellinhalt überlebende Plasmotropfen.

Die Untersuchung des Plasmas erfolgte außerhalb der Zelle fast stets mit dem Ölimmersions-Objektiv des Anoptral-Phasenkontrast-Verfahrens (hergestellt von der Firma Reichert in Wien) oder im Dunkelfeld (aplanatischer Dunkelfeldkondensor). Bei der Beobachtung innerhalb der (ausgesucht durchsichtigen) Zelle erwies sich der normale positive Phasenkontrast dem Anoptral-Kontrast überlegen, weil für das letztgenannte Verfahren eine geringere Objektdicke Voraussetzung ist.

Zur photographischen Aufnahmetechnik sei kurz bemerkt, daß die in heftiger Brown'scher Bewegung befindlichen Teilchen der Abb. 20 nur mit dem Elektronenblitz und im Dunkelfeld dargestellt werden konnten. Bei den Phasenkontrast-Aufnahmen wurden Niedervolt- oder Bogenlampe und entsprechend längere Lichtungszeiten angewandt. Versuche, den Elektronenblitz bei der Ölimmersion des Anoptral-Phasenkontrastes zu verwenden, haben durchwegs schlechte Bildschärfen ergeben.

Allgemeiner Überblick

An Aufbauelementen des Plasmas lassen sich Fibrillen (die nähere Beschreibung erfolgte bereits (vgl. [13, 14]) und Lipoid-Lamellen beobachten. Als mehr selbständige Einschlüsse des Plasmas erscheinen die Sphärosomen, Chondriosomen, Chloroplasten, Kerne und die für das Characeen-Protoplasma spezifischen Einschlüsse. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die normalerweise anzutreffenden Größen der verschiedenen Inhaltskörper bei *Nitellopsis stelligera*.

Allgemeine Bestandteile des Plasmas:

Fibrillenbündel: D = meist $< 0,2 \mu$
 Lipoidlamellen: Dicke = $< 0,2 \mu$
 Bläschenvakuolen: D = 20μ bis
 submikroskopisch
 Chondriosomen: L = $0,5 \mu$ bis $2,0 \mu$
 B = ca. $0,5 \mu$
 Sphärosomen: D = ca. $0,7 \mu$
 Pro-Sphärosomen: D = $0,1 \mu$ bis $0,4 \mu$
 Chloroplasten: D = ca. 10μ
 Kerne: D = 15μ bis 20μ

Spezifische Einschlüsse des Characeen-Protoplasmas:

Eiweißschollen: D = max. $5,0 \mu$
 Eiweiß-(?)-Kristalle: wechselnd
 Stachelkugeln: D = ca. 22μ bis
 24μ ¹⁾
 Glanzkörperchen: L = ca. 5μ
 B = ca. $1,5 \mu$
 Kugelige Teilchen der Spitzenregion:
 D = $0,5 \mu$ bis $1,0 \mu$

Untersucht man ausgepreßte Plasmotropfen im Anoptral-Phasenkontrast, so können die verschiedenen größeren Inhaltskörper an ihrer Helligkeit leicht unterschieden werden, da das Anoptral-Verfahren mit negativem Phasenkontrast arbeitet. Am hellsten erscheinen die Chloroplasten (Abb. 19).

¹ Bei *Nitella* sp., nach Härtel [6].

dann folgen die Sphärosomen, dann meist die Eiweißschollen, die aber je nach Lage und Dicke verschieden hell leuchten können. Weiters folgen die Chondriosomen, die etwa die Helligkeit der Nukleolen der Kerne haben. Die Kerne (Abb. 19) erscheinen schließlich nur mehr um ein Geringes heller als das Grundplasma bzw. der Zellsaft-Hintergrund. Die Bläschenvakuolen (Abb. 19, Abb. 5) sind bereits dunkler als der Hintergrund. Im positiven

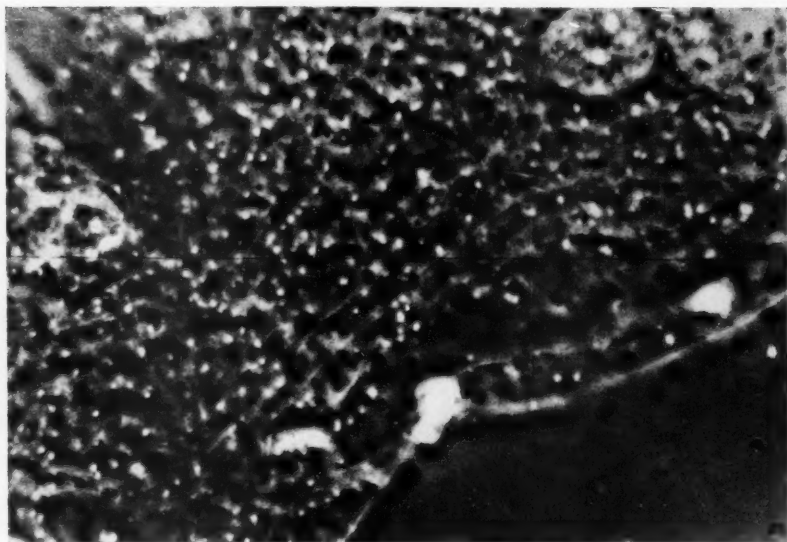


Abb. 1. Teil eines Plasmatropfens kurz nach der Verletzung des Oberflächenhäutchens. Mitte: Lipoidlamellen, links und rechts oben: nekrotische Kerne (*Nitelopsis stell.*). Anoptral-Phako-Ölimmersion.

Phasenkontrast erscheinen sie heller als der Hintergrund (Abb. 15), und es gilt dort die umgekehrte Reihenfolge der Helligkeiten, jedoch ist die Unterscheidung bei weitem nicht so genau durchführbar.

Die Lipoidlamellen

Im frisch ausgepreßten, vom Zellsaft umspülten Plasmatropfen ist lichtmikroskopisch eine Lamellenstruktur nicht auflösbar. Platzt aber die Oberfläche eines Tropfens, so kommt es sofort zur Bildung feiner, auch im Anoptral-Phasenkontrast an der Grenze der Sichtbarkeit liegender Lamellen (Abb. 1). Diese Lamellen sind doppelbrechend und werden zuerst nahe der Stelle der geplatzen Oberfläche sichtbar. Die Sichtbarkeit breitet sich aber schnell über den ganzen Tropfen aus. Wird dabei gleichzeitig ein Tropfen durch Verdunstungsströmungen unter dem Deckglas in Bewegung versetzt, so orientieren sich die Lamellen in der Strömungsrichtung des passiven

Plasmaflusses². Die Lamellen lassen bei dieser Bewegung ihre leichte Verschiebbarkeit und völlige Flexibilität erkennen. Ebenso leicht ist die Oberfläche eines frisch ausgepreßten Plasmotropfens verschiebbar, was bei äußeren Verdunstungsströmungen durch das Mitströmen des Tropfenplasmas deutlich wird (vgl. den Wirbel in Abb. 7).

Gelegentlich stoppt infolge der Lamellenbildung das Ausfließen des Tropfenplasmas, wobei aus den Lamellen eine neue Tropfenoberfläche an der geplatzten Stelle entsteht. Dies kann vielleicht als Schutz gegen mechanische Plasmaverletzungen aufgefaßt werden. Manchmal wurden in solchen Fällen Bakterien, welche ältere Tropfen häufig umschwärmten, mit eingeschlossen und bewegten sich dann entlang der Lamellen bzw. Schleifen im Innern des Tropfens.

Platzt die Tropfenoberfläche nicht frühzeitig, so kommt es oft erst nach Stunden zum Auftreten von konzentrisch geschichteten Myelinfiguren (Abb. 2), die in schön geschwungenen Schleifen große Bereiche des Tropfens durchziehen können [35, 12]. Die einzelnen sehr feinen Schichten dieser Strukturen entstehen gleichzeitig, werden durch Schichtenvereinigung immer größer und gehen schließlich in die typischen Nekrosevakuolen über.

Im ausgepreßten Plasma von Zellen, die 5 Tage bei ca. 28°C gehalten wurden, traten polar ausgerichtete Myelinfiguren auf, deren Aussehen an einen Spindelapparat erinnerte (Abb. 3).

Noch nicht im Besitze des Phasenkontrastes wurden die beschriebenen Strukturen irreführend vom Verfasser [15] als „fibrilläre Plasmadegeneration“ bezeichnet, weil parallel zu den Schichten oft Plasmabewegungen feststellbar sind. Die Schichtung ist aber zweifellos lipid-lamellenartig, doch dürften öfters die fibrillären Bewegungselemente des Plasmas angelagert sein.

Ähnliche Bildungen, wie die beschriebenen, wurden im nekrotischen

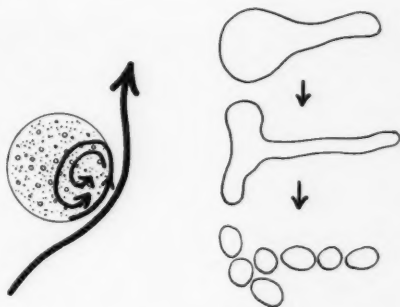


Abb. 7. Eine Flüssigkeitsströmung unter dem Deckgläschen bewirkt in einem frisch ausgepreßten Plasmotropfen eine Wirbelbildung.

Abb. 8. Drei Stadien der Veränderung einer aus der Plasmotropfen-Oberfläche ausgetretenen Myelinfigur. Die Umwandlung in die Einzelbläschen erfolgt schlagartig.

² Die bei anderen Objekten festgestellte Strömungsdoppelbrechung des Plasmas (Pfeiffer [26]) muß nicht nur auf einer Orientierung von Eiweißfibrillen beruhen, sondern kann auch in einer Ausrichtung der submikroskopischen Lipidlamellen seine Ursache haben. Dies ist sogar wahrscheinlicher, weil die beobachtbaren Fibrillen des Characeen-Plasmas bei weitem nicht die große Flexibilität gegenüber passiven Strömungen zeigen wie die Lipidlamellen.

Plasma anderer Objekte elektronenmikroskopisch dargestellt [4, 19] und auch künstlich an Phosphatlipoiden erzeugt [28].

Da alle diese innerplasmatischen Myelinfiguren aus den Lipoidlamellen des Plasmas hervorzugehen scheinen, dürfte eine strenge lichtmikroskopische Unterscheidung von Lipoidlamellen und Myelinfiguren im Plasma kaum möglich sein.

Handschuhfingerförmige Myelinfiguren treten häufig aus der Plasmotropfenoberfläche in den umgebenden Zellsaft aus [35, 12]. Bei feinen Formen dieser Art kommt es manchmal zu einem spontanen Übergehen eines Schlauches in mehrere osmotisch selbständige Bläschen, wie es Abb. 8 zeigt.

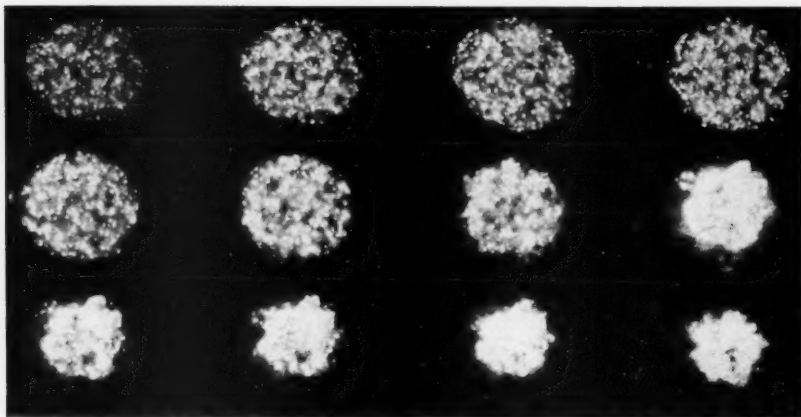


Abb. 9. Zwölf Phasen der Veränderung eines im Zellsaft liegenden Plasmatropfens im Abstand von 15 Minuten photographiert (*Nit. stell.*). In der obersten Reihe noch keine deutlichen Veränderungen, in der mittleren Reihe setzt die zunehmende Entmischung ein. Die Tropfenoberfläche ist erst im letzten Bild der untersten Reihe geplatzt. Dunkelfeld, schwache Vergrößerung.

Dieser Vorgang könnte ungefähr eine Vorstellung geben von der Entstehung der Bläschenvakuolen im Plasma.

Leitet man durch ein Präparat einer Internodiazelle kurzfristig einen schwachen elektrischen Gleichstrom, z. B. bezogen aus einem Akkumulator-Ladegerät (2 V, 0,5 A), so kommt es sofort zum reversiblen Strömungsstillstand. Wiederholt man diesen Versuch öfters, bewirkt dies eine zunehmende Schädigung der Zelle. Im Phasenkontrast erkennt man dann viele von der Strömung mitgeführte Myelinfiguren, die sehr ähnlich denen sind, die bei der Nekrose in den ausgepreßten Plasmatropfen auftreten.

Durch die Behandlung mit elektrischen Strom kann also in einfacher Weise das Lipidsystem des Plasmas auch in der Zelle geschädigt werden.

Besonders aufschlußreich ist die Beobachtung der schon beschriebenen [15] innerplasmatischen Kontraktion, die regelmäßig an älteren Plasmatropfen auftritt und deren Phasen in Abb. 9 wiedergegeben sind. Es handelt

sich hier anscheinend um einen Entmischungsvorgang, bei dem, wie die Abbildung zeigt, das Tropfenvolumen gleichbleibt.

Es ist auffallend, daß sich das innere dichte Plasma meist einseitig im Tropfen verlagert (vgl. die Abbildung in Protoplasma 50, p. 102) und daß diese Verlagerung stets in Richtung auf den Deckglasrand erfolgt — auch wenn das Präparat mit Paraffin luftdicht eingeschlossen ist. Die Erscheinung dürfte ihren Grund in der Tatsache haben, daß die Flüssigkeitsschicht unter einem kapillar angesaugten Deckgläschen stets in der Mitte am dünnsten ist, weil das Deckgläschen in der Mitte am stärksten angesaugt wird. Die kapillaren Kräfte im Plasmatropfen treiben dann anscheinend das dichte Innenplasma nach außen in den größeren Raum und die dünne umgebende Flüssigkeit gegen die Deckglasmitte in den kleineren Raum. In der Mitte unter dem Deckgläschen ist diese Erscheinung kaum zu beobachten, wie in Abb. 9. Es wäre zu überlegen, ob ähnliche Verhältnisse in Fällen von polaren Plasmolysen in pflanzlichen Geweben nicht eine gewisse Rolle spielen könnten.

Nur das innere dichte Tropfenplasma läßt Lamellen- bzw. Schleifenbildungen erkennen. Die umgebende dünne Flüssigkeit ist dagegen dazu nicht befähigt. Obwohl hier oft noch verlangsamte Fibrillenbewegungen zu sehen sind, ist die Viskosität kaum höher als die des Zellsaftes, was an der heftigen Brown'schen Bewegung der Teilchen erkannt werden kann. Beim Platzen der Tropfenoberfläche mischt sich nun die äußere Flüssigkeit sofort mit dem umgebenden Zellsaft. Zugleich hören aber alle Lebensbewegungen auf, und das innere Plasma zeigt Lamellenbildung und Nekrose. Zur Aufrechterhaltung der Lebenserscheinungen ist also die feine Lipoidmembran der Tropfenhülle unbedingt notwendig. Dies läßt sich auch an frischen Tropfen gleich nach dem Auspressen des Plasmas beobachten: nur die abgerundeten, d. h. von einer glatten Oberfläche umgebenen Tropfen überleben, alles andere koaguliert in Kürze [12].

Das lichtmikroskopische Auftreten der Lamellen beim Platzen einer Tropfenoberfläche ist wohl eine Folgeerscheinung der direkten Berührung oder Durchdringung des Plasmas mit dem Zellsaft und man kann die Lamellen auch als tropfenoberflächenähnliche (tonoplastenartige) Bildungen im Plasma auffassen. Anscheinend werden durch das den Tropfen geschlossen umgebende Lipoidhäutchen schädigende Bestandteile des Zellsaftes am Eindringen in das Plasma gehindert.

Mißt man die Wasserstoffionen-Konzentration des ausgepreßten Zellinhaltes einer großen Internodialzelle durch Aufsaugen mittels eines kleinen Stückchens Universalindikator-Papiers, so ergibt sich für den Zellsaft ein pH-Wert von ca. 5,0, während Stellen großer Plasmaansammlung etwa pH 6,0 zeigen.

Versuchsreihen, in denen das Platzen der Tropfen in verschiedenen Medien zu beobachten ist, werden genauere Aussagen über die Bedingungen der Lamellenbildung liefern.

Die Lamellenbildung ist vermutlich die Folge einer Ladungsänderung an den Lipoiden des Plasmas. Durch diese Ladungsänderung dürfte es zur Vereinigung von sublichtmikroskopischen Lipoidlamellen kommen, so daß sie lichtmikroskopisch sichtbar werden.

Ein bloßer osmotischer Wasserentzug, der die Plasmatropfen bis über

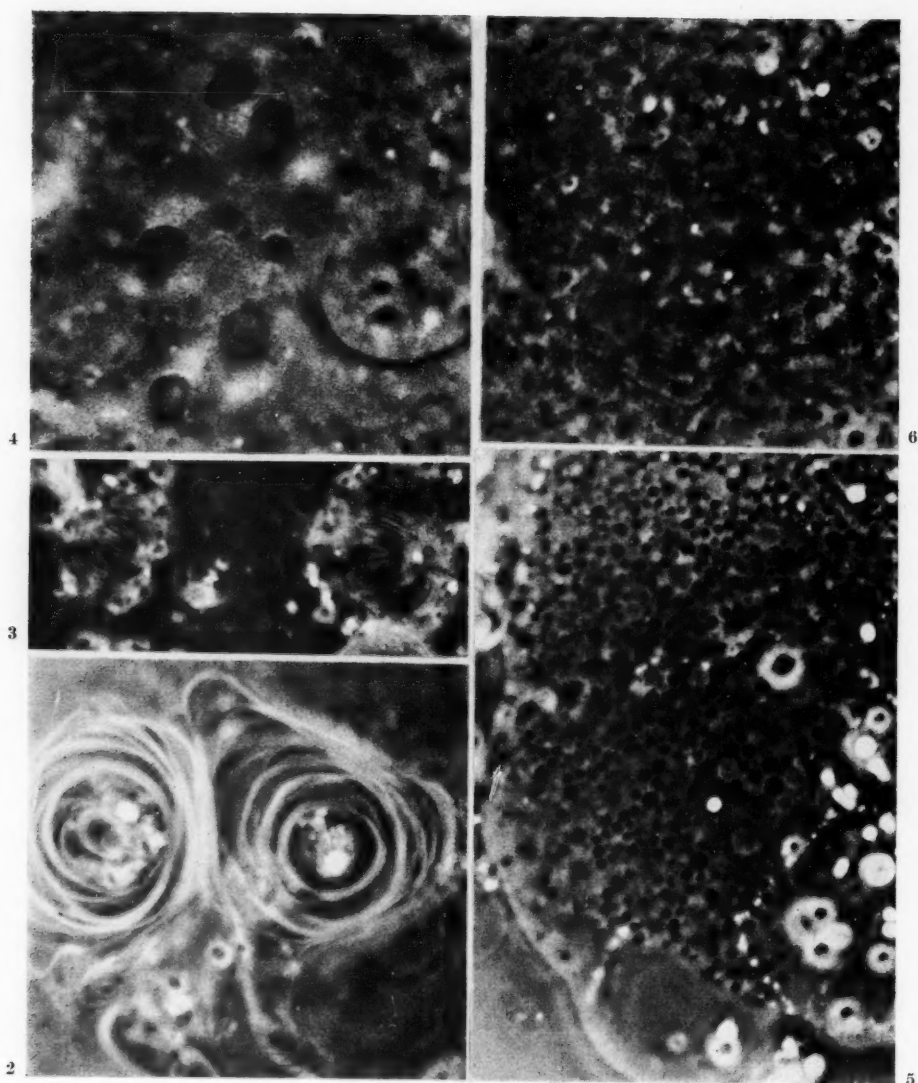


Abb. 2--6.

die Hälfte des ursprünglichen Volumens verkleinern kann [11], bedingt zwar eine mit Viskositätssteigerung verbundene Verdichtung des Plasmas, aber kein Auftreten von lichtmikroskopisch sichtbaren Lamellen.

Das Vorhandensein der das ganze Plasma durchziehenden lipoiden Substanz wurde aus den Gesetzmäßigkeiten der passiven Permeation und aus Vitalfärbungen des Plasmas erschlossen (vgl. Höfler [9]) und findet durch den direkten elektronenmikroskopischen Nachweis des Endoplasmatischen Retikulums (vgl. Sitté [30]) seine Bestätigung.

Die Beobachtungen beim Platzen der Tropfenoberfläche lassen erkennen, daß feinste Lipoidlamellen zwar im ganzen normalen Plasma vorhanden sind, daß aber der notwendige osmotische Abschluß an ein tonoplastenartiges, das Plasma geschlossen umgebendes Häutchen gebunden ist. Die sublichtmikroskopischen Lipoidlamellen des Endoplasmatischen Retikulums gewähren im fein verteilten Normalzustand diesen völligen Abschluß nicht. Sie bieten anscheinend an verschiedenen Stellen Durchlaßmöglichkeiten für die freie Diffusion. Es wäre sonst kaum verständlich, daß beim Platzen des Oberflächenhäutchens das Auftreten der Lipoidlamellen sich in kurzer Zeit über den ganzen Tropfen ausbreitet.

Die Beobachtung des endoplasmatisch kontrahierten Tropfens zeigt ferner, daß aus den Zwischenräumen des Lipoidsystems eine wäßrige Flüssigkeit entmischt werden kann, die sich zumindest durch eine geringere Wasserstoffionenkonzentration vom Zellsaft unterscheidet.

Die Bläschenvakuolen

Im *Characeen*-Protoplasma treten regelmäßig lipoidbläschenartige Vakuolen auf (Abb. 5, Abb. 19), die im Hell- und Dunkelfeld kaum, im Phasenkontrast sehr deutlich sichtbar sind. Ähnliche Bildungen sind bei anderen Objekten seit langem bekannt. Uri [33] beschreibt sie im Plasma der Fruchtfleischzellen von *Symphoricarpos racemosus* und bringt sie im Phasenkontrast photographisch sehr deutlich zur Darstellung. Seit Klemm [17] wird von einer „schaumigen Degeneration“ des Plasmas gesprochen. Die Bläschen finden sich aber auch im Protoplasma lebenskräftiger junger

Abb. 2. Grobe konzentrische Myelinfiguren in einem nekrotischen, ehemals intravakuolären Plasmotropfen von *Nit. stell.* Anoptral-Phako-Ölimmersion.

Abb. 3. Zwei Bereiche mit polaren Myelinfiguren in einem leicht nekrotischen Plasmotropfen (*Nit. stell.*, 5 Tage bei 28° C gehalten). Anoptral-Phako-Ölimmersion.

Abb. 4. Lipoidschaum an der Grenze der Auflösbarkeit. Dazwischen größere Vakuolenbläschen eingebaut. Rechts ein Kern (*Nit. stell.*). Anoptral-Phako-Ölimmersion.

Abb. 5. Nur locker verbundene Bläschenvakuolen mit verschiedenem Phasenkontrast im winterlichen Plasma. Rechts unten ein erstarrtes Fibrillenbündel mit anhaftenden Prä-Sphärosomen. Im rechten Teil des Bildes sind einige hell leuchtende Lipidtropfen zu sehen (*Nit. stell.*). Anoptral-Phako-Ölimmersion.

Abb. 6. Feine Bläschenvakuolen mit schlauchförmigen Fortsätzen. Dazwischen unscharf Chondriosomen und Sphärosomen (*Nit. stell.*). Anoptral-Phako-Ölimmersion.

Zellen, Abb. 15 zeigt sie in einer jungen Blattspitzenzelle. Im Phasenkontrast erkennt man sie leicht in jungen, stark strömenden Internodialzellen. Sie sind deshalb nicht unbedingt als ein Zeichen der Zellschädigung aufzufassen, wenn ihr Vorhandensein in großer Menge auch als Degenerationserscheinung zu deuten ist.

Ihre Verteilung im Plasma ist nicht gleichmäßig, sondern sie sind auf Zonen beschränkt. Der Durchmesser eines Bläschens reicht etwa von Zellkerndimension bis in den sublichtmikroskopischen Bereich. Bei einer gewissen Kleinheit (etwa $0,5\ \mu$ bis $1,0\ \mu$ im Durchmesser) bilden die Bläschen ein starres wabiges Gerüst, das manchmal gerade noch aufgelöst werden kann, bzw. in den sublichtmikroskopischen Bereich übergeht. Oft finden sich im feinen Wabenwerk größere Vakuolen eingeschlossen (Abb. 4). Häufig sind die feinen Waben schichtenförmig in das Lipoidhäutchen der Plasmotropfenoberfläche eingebaut. Im Dunkelfeld und bei schwächerer Vergrößerung wird durch die Waben öfters eine bläuliche Interferenzfärbung der Tropfen bewirkt — genau so, wie bei fein strukturierten *Diatomeen*-Schalen.

Die Bläschen können auch unabhängig von einander sein und zeigen dann Brownsche Bewegung. Gelegentlich kommt es vor, daß zwei sich berührende Bläschen schlagartig verschmelzen, oder daß ein Bläschen platzt.

Die Bläschen sind osmotisch selbständig. Ihr Inhalt hat etwa Zellsaftdichte. Der Phasenkontrast von nebeneinanderliegenden Bläschen ist aber öfters verschieden, was auf eine verschiedene Dichte des Inhalts hinzuweisen scheint.

In seltenen Fällen finden sich in den Bläschen Sphärosomen in Brownscher Bewegung, ja sogar Fibrillen. Dies gestattet die Annahme, daß die Bläschen infolge einer „Plasmaverdünnung“ (vgl. die Diskussion über Vakuolenentstehung bei Sitté [50]) oder aus feinen Lipoidlamellen in einer Weise entstehen, wie es etwa die Abb. 8 zeigt. Sehr selten wurden Bläschen beobachtet, die ein ähnliches, kleineres beinhalten.

In jungen Zellen, besonders deutlich sichtbar in Rhizoidzellen, werden

Veränderungen während der Nekrose an einem Plasmotropfen mit wabig verbundenen Lipoidvakuolen. Der zeitliche Abstand der Aufnahmen beträgt 5 bis 10 Sekunden zwischen den einzelnen Bildern (*Nit. stell.*).

Abb. 10. Die rechts unten sichtbaren Kerne zeigen noch ungeschädigtes Aussehen.

Abb. 11. Krampfartige Spannungsänderungen bewirken eine Deformation der einzelnen Bläschen. Einige werden verkleinert oder sind verschwunden. Die Kerne erscheinen bereits granuliert. Unterhalb der Bildmitte liegt eine Eiweißscholle in der Schärfenebene.

Abb. 12. Aus der Tropfenoberfläche sowie in die große Vakuole ragen krampfartig bewegte Protuberanzen.

Abb. 13. Es herrscht wieder Ruhe. Die Bläschen zeigen Abrundungen durch die Oberflächenspannungskräfte, wie sie auch im leblosen Schäumen vorkommen. Anoptral-Phako-Olmmersion.

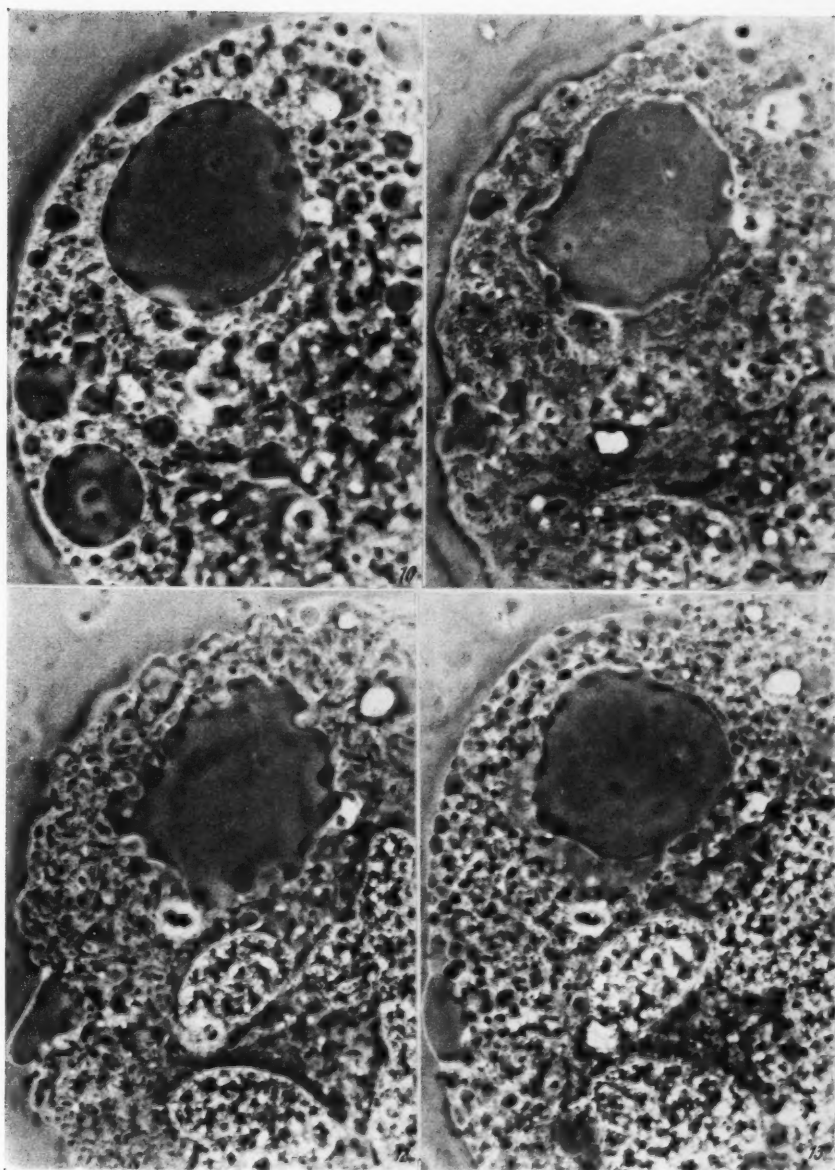


Abb. 10—13.

die hier oft ovalen Bläschen von der Plasmaströmung zu langen, lamellenförmigen Bildungen deformiert bzw. ausgezogen.

In Zellen, die mehrere Tage dunkel gehalten wurden, traten öfters Bläschen auf, die durch eine gerade Querwand geteilt waren.

Im Wärmeplasma (Zellen 3 Tage bei 28°C) erschienen die Bläschen meist sehr zahlreich und erfüllten oft in Form von feinen Waben den ganzen Tropfeninhalt. Diese Tropfen ließen in ihrem Inneren überhaupt keine Brownsche Bewegung erkennen und konnten auch durch starkes Drücken auf das Deckgläschen kaum zum Platzen gebracht werden.

Gelegentlich gingen die Bläschen in sehr feine Schläuche über (Abb. 6). Diese Schläuche endeten blind und zeigten auch Verzweigungen. Oft ließen sich perlschnurartige Übergangsstadien beobachten. Ob hier eine Entstehung der Bläschen aus Schläuchen vorliegt (etwa im Sinne der Abb. 8), oder der umgekehrte Vorgang, konnte nicht festgestellt werden.

Auffallend ist das Verhalten von wabig miteinander verbundenen Bläschen bei der Nekrose (an einzelnen unabhängigen Bläschen konnte das Folgende nicht beobachtet werden). Abb. 10 bis Abb. 13 zeigt vier im Abstand von 5 bis 10 Sekunden aufgenommene Phasen des Nekrosevorganges. Anscheinend wurde hier der Plasmotropfen in kurzer Zeit vom Zellsaft durchdrungen. In Abb. 10 leuchten die Zellkerne, deren Nekrose immer der Plasmanekrose vorausgeht, noch gleichmäßig diffus. In den Abb. 11, 12 und 13 zeigen sie schon eine zunehmende Granulation. In den Abb. 11 und 12 geht plötzlich unter teilweisem Verschwinden von Vakuolenbläschen eine Spannungsänderung durch die Lipoidmembranen, wobei in die großen Vakuolenbläschen, bzw. aus der Tropfenoberfläche Protuberanzen vorquellen. In Abb. 13 ist bereits wieder Ruhe eingetreten. Die Vakuolenbläschen sind wieder vergrößert und schon nekrotisch abgerundet. Bemerkenswert ist der hyaline Saum an der großen Vakuole, wohl ein neu entstandenes Entmischungsprodukt.

Ähnliche Veränderungen der Tropfenoberfläche lassen sich — teilweise auch reversibel — durch schwache elektrische Ströme erzielen, die man vorsichtig durch das Präparat leitet.

Beim Versuch, die Fibrillenbewegung durch elektrische Felder zu beeinflussen (negatives Resultat), wurde das gegen den Mikroskoprevolver durch ein breites Kunststoffgewinde isolierte Ph.-Öl-Imm.-Objektiv von einem Pol einer Influenzmaschine aufgeladen. Das Mikroskop war geerdet und unter dem Objektträger in der Mitte der Kondensor-Frontlinse ein kleines Metallblättchen angeklebt, das mit dem Stativ leitend in Verbindung stand. Immer kurz danach, wenn ein Entladungsfunkeln auf bzw. um das mit Paraffin eingeschlossene Präparat gesprungen war, zeigte die Tropfenoberfläche Kräuselungen und Protuberanzen in der oben geschilderten Art. Die Oberfläche glättete sich stets wieder. Nach mehrmaliger Wiederholung koagulierte der Tropfen.

Der beschriebene Versuch zeigt, daß auch die Lipoidbläschen, wie die zuerst behandelten Lipoidlamellen gegenüber elektrischen Strömen besonders empfindlich sind. Vielleicht liegen auch hier Ladungsänderungen diesem Geschehen zugrunde.

Allgemein kann vermutet werden, daß die Bläschenvakuolen ein durch Oberflächenspannungskräfte umgewandeltes und beherrschtes Endoplasmatisches Retikulum darstellen.

Die Sphärosomen und ihre Vorstadien

Die aus den Zellen höherer Pflanzen bekannten Sphärosomen (Perner [23], früher als „Mikrosomen“ bezeichnet, vgl. auch Höfler [8]) finden sich auch bei den *Characeen*. Sie erscheinen im Hellfeld und Phasenkontrast als auffallende Körper und im Dunkelfeld als leuchtende Punkte oder kleine Ringe (Abb. 20). Ihr Durchmesser liegt bei Internodialzellen von *Nitellopsis stelligera* etwa um $0,7 \mu$, doch schwanken die Werte. Im Dunkelfeld erkennt man Übergangsstadien zu kleineren Körpern, die vor allem im Ultramikroskop gut sichtbar sind ($D = \text{ca. } 0,1 \mu$ bis $0,4 \mu$) und heftige Brownsche Bewegung zeigen (Abb. 20). Man möchte annehmen, daß die Sphärosomen aus diesen Körpern, die daher als „Präsphärosomen“ bezeichnet sein sollen, entstehen. Die Präsphärosomen sind jene „kleinen Mikrosomen“ [13], die stets den Fibrillen anhaften (Abb. 5). Wahrscheinlich sind die meisten Präsphärosomen an Trägerfibrillen gebunden. Im Ultramikroskop können diese am gemeinsamen Trift mehrerer Teilchen leicht erkannt werden. Die häufige, plötzliche Stabilisierung eines zuerst in Brownscher Bewegung befindlichen Präsphärosoms deutet auf solch eine Bindung hin. Damit ist auch in Übereinstimmung, daß die Präsphärosomen die von der Plasmaströmung am ehesten bewegten Teilchen sind (vgl. [14]).

Die Präsphärosomen entstehen anscheinend sublichtmikroskopisch an den Fibrillen. Wenn ein Präsphärosom größer geworden ist und im Dunkelfeld als flächiger Körper oder als Ring erscheint, verliert es die Haftfähigkeit zu den Fibrillen. Es werden aber nur wenige Präsphärosomen zu ausgeprägten Sphärosomen. So hatte z. B. ein kleiner Plasmotropfen von *Nitellopsis stell.* ($D = 24 \mu$, $\text{Vol.} = 7235 \mu^3$) grob geschätzt ca. 400 bis 500 Präsphärosomen und nur 40 Sphärosomen. Das Verhältnis zwischen Sphärosomen und Präsphärosomen ist also etwa 1 : 10. Meist sind gleich große Präsphärosomen und gleich große Sphärosomen deutlich voneinander unterscheidbar (Abb. 20) und Übergangsstadien sind selten. Der Übergang dürfte etappenweise erfolgen.

Bei Lichtentzug (Pflanzen 10 Tage im Dunkeln) ließen sich keine kleinen Präsphärosomen mehr nachweisen bzw. ihre Größe lag an der Grenze der Nachweisbarkeit, dagegen konnten viele Übergangsstadien zu Sphärosomen beobachtet werden. Außerdem waren viele Riesensphärosomen entstanden ($D = \text{ca. } 3,0 \mu$). Diese bildeten Übergänge zu großen Lipoidtropfen, wie sie häufig auch bei Zellen vorkommen, die im Winter im Schlamm zu finden sind (Abb. 5).

Wie Perner [23] an den Sphärosomen von *Allium cepa* gezeigt hat, enthalten sie einen Eiweißanteil. Auch die bei den *Characeen* vorkommenden Sphärosomen zeigen nach Fixierung mit Methanoleisessig und Behandlung mit Amidoschwarz eine deutliche Färbung. Wenn die Präsphärosomen an den Proteinfibrillen des Plasmas entstehen, kann ihr Verschwinden

bei längerem Lichtmangel als Folge der verminderten Eiweißsynthese durch den schlechten Ernährungszustand beim Assimilationsausfall gedeutet werden. Man kann ferner vermuten, daß bei der Umbildung von Präsphärosomen zu Sphärosomen vor allem eine Zunahme der Lipoidsubstanz erfolgt, während der Eiweißgehalt kaum mehr vermehrt wird.

Eine zumindest äußerliche Umwandlung von Präsphärosomen in Sphärosomen erfolgt schnell (in wenigen Stunden) bei dem als „globuläre Degeneration“ der Fibrillen beschriebenen Zustand [15]. Hier legen sich die Präsphärosomen oft flächig zusammen und lassen häufig eine Vergrößerung bzw., wie Sphärosomen, ein Lumen erkennen (Abb. 21, Abb. 22).

Über eine der möglichen Funktionen der Sphärosomen bzw. Präsphärosomen gibt vielleicht folgende Beobachtung Aufschluß [11]:

Eine Internodialzelle von *Nitella opaca*, die schon etwas unterirdisch gewachsen war, hatte an einem Ende eine leichte Krümmung. Als sie präpariert am Objektträger lag, zeigte es sich, daß eine leichte Verschiebung des Deckgläschens eine Faltenbildung an einer gewissen Stelle der Zellwand bewirkte, die durch entgegengesetztes Verschieben wieder zum Verschwinden gebracht werden konnte. Drei der kurzen, locker gelagerten Chloroplastenketten zeigten im Bereiche der stärksten Faltenbildung geschädigtes Aussehen. Die Strömung war langsam. Plötzlich sammelten sich Sphärosomen in der Umgebung der Falten an. Entfernung der Falten zog zuerst keine Veränderung nach sich. Nachdem aber die Falten wieder erzeugt worden waren, bewirkte die neuerliche Entfernung eine merkwürdige Veränderung: Die kreisförmigen Konturen der Sphärosomen verschwanden plötzlich alle gleichzeitig und die ganze Ansammlung erstarrte spontan zu einer formlosen Masse. Die Plasmaströmung ging indessen ungestört weiter und brachte neue Sphärosomen herbei, die sich an der selben Stelle erneut ansammelten. Die Ansammlung war nun durch Stunden zu beobachten, ohne daß durch Faltenbildung eine Veränderung bewirkt werden konnte. Am nächsten Tag war an der selben Stelle keine auffallende Sphärosomenansammlung mehr zu sehen, die drei geschädigten Chloroplastenketten lagen aber noch wie am Tag vorher. Trotz aller Bemühungen gelang eine neuerliche Faltenbildung nicht mehr (Hellfeld-Beobachtung).

Ähnliche Ansammlungen an Verletzungen zeigen auch die Präsphärosomen. (Über das Zustandekommen der Ansammlung vgl. [14].) Das beschriebene spontane Verschwinden der Sphärosomen im Plasma ist deshalb besonders bemerkenswert, weil sonst auch beim Platzen und der Koagulation eines Plasmatropfens die Sphärosomen noch längere Zeit ihre Gestalt beibehalten, wie Höfler und Url [10] auch an den Sphärosomen des nekrotischen Plasmas von *Allium cepa* beobachteten. Die Sphärosomen bzw. Präsphärosomen dürften an Verletzungen durch einen aktiven Vorgang zur Wundheilung geopfert werden.

Die Chondriosomen

Die Chondriosomen des *Characeen*-Plasmas sind kleine, schwer sichtbare Körper, die nur im Phasenkontrast deutlich sind. Ihre Zahl ist etwa ein- bis zweimal so groß als die der Sphärosomen (ohne Präsphärosomen, vgl. oben). Es lassen sich bei *Nitellopsis stelligera* drei verschiedene Formen unterscheiden:

- a) länglich-ovale, $L = 0,5-2,0 \mu$, $B = \text{ca. } 0,5-0,5 \mu$ (Abb. 14 a, g, Abb. 17)
 (die längeren Formen dieser Art sind meist quer eingeschnürt),
 b) ovale bis kugelförmige, $D = \text{ca. } 1,2 \mu$ (Abb. 14 b),
 c) beistrich- bis spindelförmige, $L = 1,5 \mu$, $B = \text{ca. } 0,3 \mu$ (Abb. 14 c, d, e) ¹.

Alle drei Formen sind meist nebeneinander sichtbar, zumindest aber zwei. Zwischen Form a und Form b gibt es Übergangszustände, wenn auch gewöhnlich in einem Plasmotropfen beide Arten deutlich zu trennen sind.



Abb. 14. Chondriosomen von *Nitellopsis stelligera*. Zeichnungen nach Phasenkontrast-Beobachtung. a) länglich-ovale, b) abgerundete, c) spindel- bis beistrichförmige, d) eine Spindelform in drei Ansichten; in der mittleren Ansicht erscheint die Kontur unscharf, e) möglicher Teilungsvorgang der Spindelformen (stärkere Vergrößerung), f) schlauch- bzw. kettenförmige Teilungsstadien der länglichen Formen, g) Bereich zusammenliegender länglicher Formen, der von feinen Lipoidlamellen umgeben ist, h) nekrotische Hantelformen, rechts ein durch passive Bewegung in die Länge gezogenes Chondriosom (stärkere Vergrößerung), i) unregelmäßig gebaute Riesenformen aus einer Zelle, die im Winter aus einem zugefrorenen Teich entnommen wurde.

Ovale Formen können noch zweigeteilt sein, die kugelförmigen sind es dagegen niemals, so daß angenommen werden kann, daß es sich bei den kugelförmigen um Altersstadien der Form a handelt. Der Übergang muß etappenweise erfolgen.

Seltener sieht man lange Ketten (Abb. 14 f). Diese Ketten entstehen

anscheinend aus Stadien, an denen noch keine Querdurchschnürungen erkennbar sind. Es scheint kein Zweifel, daß hier Teilungsstadien und Phasen der Chondriosomenentstehung vorliegen.

Die Chondriosomen der Form a und Form b sind sehr oft nicht gleichmäßig im Plasma verteilt, sondern finden sich in Zonen gehäuft. Um diese Zonen, die meist viele quergeteilte Formen enthalten, erkennt man gelegentlich zarte Lipoidlamellen (Abb. 14 g).

Im nekrotischen Plasma kommt es zu einer Abrundung der langgestreckten Chondriosomen der Form a, wie es auch Höfler und Uri [10] bei *Allium cepa* beschreiben. Eine besondere Art der nekrotischen Veränderung sind hantelförmige Chondriosomen (Abb. 14 h). Diese können als a-Formen aufgefaßt werden, deren Endteile sich abgerundet haben und durch den schlauchförmigen Mittelteil zusammengehalten werden. Obwohl hantelförmige Chondriosomen auch normalerweise vorkommen sollen [25], dürfte dies nicht für das *Characeen*-Plasma gelten.

Die Gestalt der Form c läßt sich lichtmikroskopisch wegen ihrer Kleinheit kaum in allen Dimensionen erfassen¹. Die Kontur dieser Teilchen wird nämlich bei einer gewissen Lage verschwommen (Abb. 12 d, Mitte). Auch werden sie im nekrotischen Plasma oft undeutlicher. Die Teilung dürfte so ablaufen, wie es Abb. 14 e zeigt, doch ist diese Darstellung wegen der Kleinheit als fraglich anzusehen. Jedenfalls findet man häufig, wie auch bei Form a, parallel nebeneinander liegende Exemplare. Für die Annahme einer Längsspaltung [31] fehlen aber die Teilungsstadien. Wahrscheinlich gleiten vielmehr die Teilstücke nach der Querteilung nebeneinander.

In den Verdunkelungsversuchen konnte keine deutliche Beeinflussung der Chondriosomen festgestellt werden, vielleicht deshalb, weil die Zellen untereinander ein zu unterschiedliches Aussehen der Chondriosomen aufweisen. Dagegen waren bei Internodialzellen, die im Winter aus dem Schlamm des oben zugefrorenen Teiches entnommen wurden, abnorme Verhältnisse zu beobachten: Die Chondriosomen ließen Riesenformen ($L = 7,0 \mu$ und mehr) und oft Verzweigungen erkennen, wie es Abb. 14 i zeigt. Ähnliche Verzweigungen sind elektronenmikroskopisch nach Rekonstruktion aus Schnitterien auch an tierischen Zellen gefunden worden [1].

Die Kerne

In der Scheitelzelle ist um den Kern ein hyaliner Hof zu erkennen. Wohl im Verlauf der noch mitotischen Kernteilung erscheint der Kern hier oft aus vielen Stückchen zusammengesetzt. Durch die inäquale Teilung der Scheitelzelle entstehen bekanntlich abwechselnd Knoten- und Internodialzellen. Nach Walther [34] geben die Kerne der Knotenzellen schwächere Nu-

¹ Wie die inzwischen vorgenommene elektronenmikroskopische Untersuchung ergab, handelt es sich bei den hier zur Form c gestellten Bildungen (Abb. 14 c, d und e) nicht um Chondriosomen, sondern wahrscheinlich um die aus der elektronenmikroskopischen Literatur bekannten Golgi-Körper. Danach sind diese Körper lichtmikroskopisch also leicht mit den Chondriosomen zu verwechseln.

klearreaktionen als die der Internodialzellen. Scheitelzellen, Knotenzellen, kurze Blattspitzenzellen und junge Internodial- bzw. Blattzellen sind ein-kernig. Beginnen die beiden letztgenannten Zellen ihr Längenwachstum, setzt auch die Fragmentation der Kerne ein.

In sehr großen Internodialzellen von *Nitella* (Länge 8 cm) schätzt Kisser [16] 6000 bis 8000 Kernstücke. Während die Kerne in den ausgewachsenen Internodialzellen oft Wurst- oder Nierenformen haben (Abb. 26), sind sie bei der Fragmentation in jüngeren Zellen zuerst kugelig bis oval (vgl. Abb. 19) und werden dann durchgeschnürt (Näheres über die Fragmentation und die damit verbundene Rotation der Kerne bei Fetzmann [5], über den Durchschnürungsvorgang vgl. auch [13]).

Jeder Kern läßt mehrere Nukleolen erkennen. Die Anzahl der Nukleolen in den Kernen einer Zelle kann verschieden sein. Die Nukleolen erscheinen oft spindelförmig langgestreckt und runden sich bei längerer Beobachtung (Lichteinwirkung) ab. Sie teilen sich im Zusammenhang mit der Fragmentation. Dagegen ist nur in einem einzigen Kern einer großen Internodialzelle (*Nitella*) ein Chromozentrum nachweisbar (Heitz [7]).

Bei der Nekrose des Plasmas zeigt der Kern stets vor dem Plasma das granuliert, nekrotische Aussehen (vgl. Abb. 13 gegenüber Abb. 10). Meist kontrahiert sich dabei der Kerninhalt und löst sich von der Kernmembran ab (Abb. 26). Oft werden an der Kernmembran zugleich Blähungen sichtbar, die schon Strugger [32] an Kernen nekrotischer Zellen beschreibt. (Bei Strugger auch weitere pathologische Kernveränderungen.) Gelegentlich zeigten die Teilchen des Kerninneren Brownsche Bewegung, obwohl das umgebende Plasma noch keine Nekroseerscheinungen aufwies. Vielleicht besteht hier eine Analogie mit der von Strugger durch 0,1 mol KNO_3 erzielten Verflüssigungen der Kerne (*Chara fragilis*).

In bestimmten Zellen ist die Fragmentation gehemmt. So beschreibt Johow [15] lange, bandförmige Kerne in den Rindenzellen von *Chara*. Auch in den Rhizoidzellen von *Chara* sind die Kerne lang-fadenförmig ausgezogen und oft gitterartig durchbrochen (Linsbauer [18]). Die Nukleolen dieser Kerne erscheinen ebenfalls ganz langgestreckt (Zacharias [36]).

Die Chloroplasten

Die Chloroplasten sind in der ruhenden peripheren Plasmaschicht kettenförmig aneinandergereiht (über das zusammenhaltende Substrat vgl. [14]). Während sie im Anoptral-Phasenkontrast hell überstrahlt aufleuchten (Abb. 19), zeigen sie im positiven Phasenkontrast bei frisch gewachsenen Zellen sehr schön die Grana (Abb. 16).

Im Normalzustand langgestreckt, runden sie sich während der Zellnekrose ab. Durch intensive Beleuchtung bleichen sie und werden schließlich zerstört (Pringsheim [27]). Bei der Nekrose werden in den Chloroplasten die Stärkekörner deutlich (Abb. 17), die in frisch gewachsenen Zellen im Normalzustand kaum sichtbar sind. In älteren Zellen lassen sich die Stärkekörner auch im Hellfeld stets gut erkennen. Die unterirdisch im Schlamm wachsenden Internodialzellen und besonders die Überwinterungs-

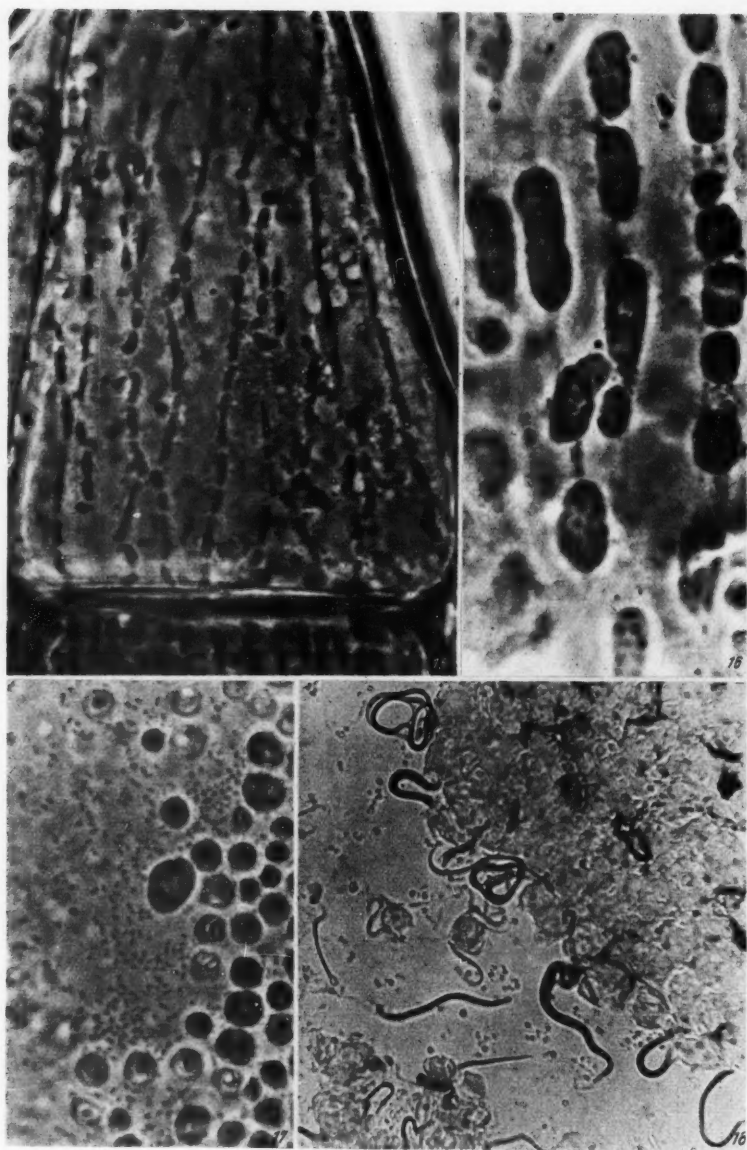


Abb. 15—18.

knöllchen enthalten farblose Plastiden mit auffallend großen Stärkekörnern.

Die Plastiden sind bereits in der Hauptscheitelzelle als farblose, peripher liegende Schleifen (Proplastiden) feststellbar. In Scheitelzellen von Nebensprossen haben sie schon eine grünliche Färbung. Nach der Teilung der Scheitelzelle und mit dem eintretenden Längenwachstum der Zelle beginnen sie sich zu teilen. In den Internodial- bzw. Blattzellen entstehen dann durch fortgesetzte Querteilungen die Chloroplastenketten. Anscheinend ist öfters die mit Querteilung verbundene Längenzunahme der Chloroplastenketten größer als das Längenwachstum der Zelle. Deshalb sieht man in jüngeren Zellen die Chloroplastenketten häufig in Zick-Zack-Linien angeordnet (Abb. 15).

Nach Mirande [20] sind bei *Chara* die Chloroplasten stellenweise durch Plastidensubstanz zu Ketten verbunden. Auch in älteren Internodialzellen dürfte die Teilung nicht mehr zu Ende geführt werden. Die Chloroplasten bleiben dann teilweise eingeschnürt.

Es wäre möglich, daß die Plastidenteilung ähnlich abläuft wie die Fragmentation der Kerne, indem sie von den Fibrillen des Plasmas durchgeschnürt werden (vgl. [13]).

Barg [2] beschreibt lange große Chloroplasten beiderseits des Indifferenzstreifens. Nach eigenen Beobachtungen können dort fast immer nur abgerundete gefunden werden. Diese sind es dann auch, die sich infolge weniger fester Verankerung in der Wandschicht leicht lösen können und in die Strömung geraten. Längere Zeit von der Strömung mitgeführte Plastiden erscheinen sehr blaß und sind anscheinend durch Quellung vergrößert.

In unterirdisch frisch gewachsenen Internodial- und Rhizoidzellen werden die Plastiden farblos und sehr zart ausgebildet. Über die Entstehung von Chloroplasten aus eventuell im Plasma vorhandenen Proplastiden (vielleicht aus gewissen hier zu den Chondriosomen [Form c ?³] gerechneten Körpern), konnten keine Beobachtungen gemacht werden.

In mit Paraffin eingeschlossenen Präparaten des ausgepreßten Zellinhaltes treten nach einigen Tagen stets Entmischungserscheinungen an den im Zellsaft herumliegenden Chloroplasten auf (Abb. 18, die überlebenden

³ Ein Primärgranum, wie bei den Proplastiden der höheren Pflanzen, war nie zu erkennen, ebensowenig eine amöboide Beweglichkeit.

Abb. 15. Kleine Blattspitzenzelle von *Nitellopsis stell.* Im Plasma Bläschenvakuolen. Posit. Phako-Ölimmersion.

Abb. 16. Grana in einer frisch gewachsenen Internodial-Zelle von *Nit. stell.* Posit. Phako-Ölimmersion, sehr stark vergrößert.

Abb. 17. Abgerundete Chloroplasten am Indifferenzstreifen einer etwas geschädigten Internodialzelle von *Nit. stell.* Zum Teil sind in den Chloroplasten die Stärkekörner deutlich. Viele Chondriosomen liegen der Wand an. Posit. Phako-Ölimmersion.

Abb. 18. Lipide Entmischungsfiguren an toten, mehrere Tage im Zellsaft liegenden Chloroplasten. Hellfeld, Ölimmersion.

Plasmatropfen sind zu diesem Zeitpunkt schon längst koaguliert). Diese Körper entstehen aus Chloroplasten. Sie erinnern an Myelinfikturen, zeigen aber eine relativ feste Konsistenz und keine Vibration durch Brownsche Bewegung im Dunkelfeld. Im Hellfeld erscheinen die dickeren Figuren braun gefärbt und lassen im UV-Licht eine rote Eigenfluoreszenz erkennen. Dies deutet auf das Vorhandensein von Chlorophyll hin. Oft sind Aufspaltungen zu sehen oder, aus dem Inneren herausragend, ein feiner Docht. Anscheinend bilden hier die das Chlorophyll extrahierenden Chloroplasten-Lipoide diese merkwürdigen Formen.

Über die Chromoplasten der Antheridienzellen sind dem Verfasser keine genaueren Angaben bekannt.

Spezifische Einschlüsse des *Characeen*-Protoplasmas

Eiweißschollen: Im Plasma älterer Internodial- und Blattzellen finden sich stets starre, unregelmäßig geformte Körper von sehr verschiedener Größe (Abb. 23, Abb. 11). Bei den *Chara*-Arten sind diese Körper in auffälliger Menge und Größe anzutreffen, so daß sie die mikroskopische Beobachtung des übrigen Plasmas stören. Sie bestehen anscheinend größtenteils aus Eiweiß, da sie sich in HCl-Pepsin auflösen.

Im Phasenkontrast ist zu erkennen, daß die Schollen häufig in Vakuolenbläschen eingeschlossen sind. Sie entstehen im Plasma und werden dann in den Zellsaft abgegeben. Am Indifferenzstreifen konnten öfters abgetrennte Plasmabereiche („Plasma-Amöben“) beobachtet werden, die alle Übergangsstadien zu diesen Schollen zeigten. Die deutlich kontrastierten Präsphärosomen waren dort in bestimmten Stadien nicht mehr voneinander zu unterscheiden. Außerdem dürften die Schollen aber auch im strömenden Plasma entstehen können.

Abb. 19. Plasmatropfen von *Nit. stell.*, Übersicht. Die Chloroplasten leuchten ganz hell. Im oberen Bildteil mehrere Zellkerne neben Bläschenvakuolen. Anoptral-Phako, mittlere Vergrößerung.

Abb. 20. Elektronenblitzaufnahme eines Tropfenteils. Die abgebildeten Sphärosomen und Prä-Sphärosomen zeigten heftige Brownsche Bewegung. Dunkelfeld, aplanatischer Dunkelfeldkondensor, Ölimmersionsobjektiv, Multiblitzz von Leitz.

Abb. 21 und 22. Flächig zusammengeballte und vergrößerte Prä-Sphärosomen bei der „globulären Fibrillendegeneration“ des Plasmas (vgl. 13). Dunkelfeld, Aplanat. Dunkelfeldkondensor, Ölimmersion.

Abb. 23. Eiweißschollen von *Nit. stell.*, Anoptral-Phako-Ölimmersion.

Abb. 24 und 25. Eiweiß(?)-Kristalle aus dem Plasma von *Nit. stell.* Anoptral-Phako-Ölimmersion.

Abb. 26. Zwei nekrotische Kerne von *Chara foetida*. Der Kerninhalt hat sich kontrahiert und von der Kernmembran abgelöst. Dunkelfeld, Kardioid-Kondensor. Ölimm.

Abb. 27. Nebensproßspitze von *Nit. stell.* In den auf die Scheitelzelle folgenden Zellen sind kugelige Teilchen erkennbar (durch Pfeile bezeichnet). Hellfeld, Ölimm.

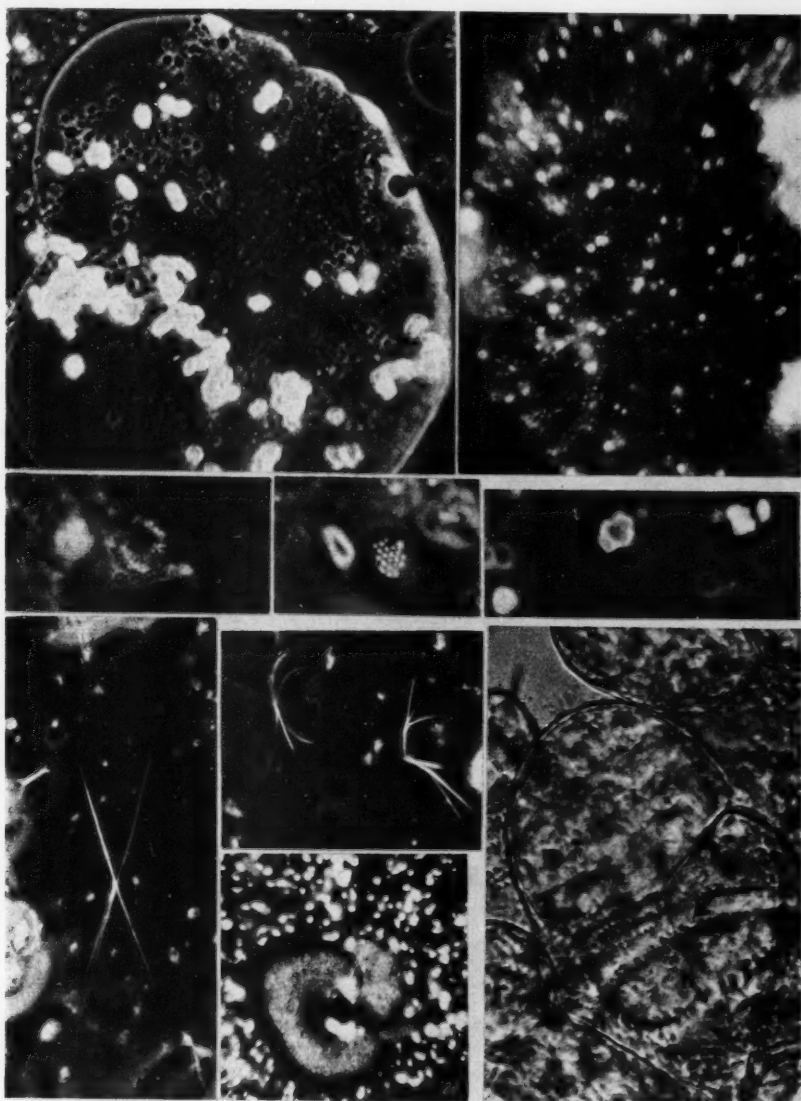


Abb. 19—27.

Wird eine Zelle mit der Nadel eines Mikromanipulators angestochen [21, 22], so bewirkt der Turgordruck ein heftiges Ausströmen besonders von Zellsaft aus der Öffnung. Häufig bildet sich aber ein Propfen, der den Ausfluß stoppt und das Leben der Zelle rettet. Dieser Propfen wird hauptsächlich aus durch Plasma verklebten Eiweißschollen des Zellsaftes gebildet.

Stachel- und Blaskugeln: Da dem Verfasser keine *Nitella*-Arten zur Verfügung standen, konnten über die nur bei dieser Art vorhandenen Stachel- und Blaskugeln keine Beobachtungen gemacht werden (vgl. Härtel [6]). Möglicherweise entspricht der Inhalt der Stachelkugeln chemisch den beschriebenen Eiweißschollen.

Eiweiß(?) - Kristalle: Im Dunkelfeld erkennt man häufig im strömenden Plasma feine, zirka chloroplastenlange Kristallspieße. Im ausgepreßten Zellinhalt lassen sie sich gut im Phasenkontrast untersuchen. Sie erscheinen oft verwachsen und der Länge nach gespalten (Abb. 24) oder sind gebogen (Abb. 25). Ihre Größe ist nicht selten an der Grenze der Sichtbarkeit. Auf Grund ihrer Form kann vermutet werden, daß es sich hier um Eiweißkristalle handelt. Vielleicht breiten sich die oben beschriebenen entmischten Chloroplasten-Lipoide entlang solcher sehr feiner Kristalle aus.

Kugelige Teilchen der Spitzenregion: In der 2. und 3. Zellgeneration (von der Scheitelzelle gerechnet) sind bei *Nitellopsis stell.* stets kugelige Körper in unbewegter peripherer Lage zu sehen (Abb. 27). Sie haben etwa das Aussehen und die Größe von Sphärosomen, machen aber einen mehr kompakten Eindruck. In der Scheitelzelle selbst sind sie nicht zu erkennen.

Glanzkörperchen: Der Vollständigkeit halber seien hier auch diese im Spitzenplasma der Rhizoidzellen liegenden stets länglichen Körper erwähnt (bei *Nit. stell.* $L = \text{ca. } 5,0 \mu$, $B = \text{ca. } 1,5 \mu$), denen man Statolithenfunktion zugesprochen hat [3].

Zusammenfassung

Characeen-Protoplasma (besonders von *Nitellopsis* [= *Tolypellopsis*] *stelligera*) wurde sowohl in der Zelle als auch in Form überlebender, in den Zellsaft ausgepreßter Tropfen lichtmikroskopisch untersucht (Hell- und Dunkelfeld, positiver Phasenkontrast und negativer Anoptal-Phasenkontrast).

Die verschiedenen Strukturen und Inhaltskörper des Plasmas werden mit Ausnahme der Fibrillen (vgl. [13, 14]) beschrieben und ihre Entstehung und Funktion nach Möglichkeit besprochen. Folgende bemerkenswertere Beobachtungen seien hier herausgegriffen:

1. In den ausgepreßten Plasmotropfen kommt es allmählich zu einer irreversiblen Entmischung des Plasmas (Abb. 9), ohne daß die Lebensbewegungen aufhören.

2. Platzt das tonoplastenartige Oberflächenhäutchen eines Tropfens, so bilden sich sofort überall im Tropfen feinste, doppelbrechende Lipidlamellen (Abb. 1) und die Lebensbewegungen erlöschen.

3. Eine besondere Form der lipoiden Bläschen- und Vakuolen, die von anderen Objekten bekannten wabigen Schaumvakuolen des Plasmas, zeigen im Zusammenhang mit der Nekrose auffallende Spannungsänderungen bzw. Kontraktionen (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12, Abb. 13).

4. Es wird angenommen, daß die Sphärosomen aus sehr kleinen Teilchen ($D = 0,1 \mu$ bis $0,4 \mu$, Abb. 20) entstehen, die als „Präsphärosomen“ bezeichnet werden und den Fibrillen anhaften.

5. Es lassen sich drei Typen von Chondriosomen unterscheiden (Abb. 14 a, b und c). Verzweigte Riesenchondriosomen fanden sich in Zellen, die im Winter einem zugefrorenen Teich entnommen wurden (Abb. 14 i).

6. Im Plasma lassen sich bei *Nitellopsis stell.* spießförmige, vermutlich aus Eiweiß bestehende Kristalle nachweisen (Abb. 24, Abb. 25).

7. In ganz jungen Zellen (mit Ausnahme der Scheitelzelle) treten (bei *Nitellopsis stell.*) nicht näher bestimmte, kugelige Teilchen auf (Abb. 27).

Literatur

- [1] Bang, B. G., and F. B. Bang, 1957: Graphic Reconstruction of the third Dimension from Serial Electron Micrographs. *Ultrastructure Research* 1, 138.
- [2] Bang, T., 1945: Über die Indifferenzstreifen der Characeen. *Protoplasma* 37, 293.
- [3] Buder, J., 1946: Kurze Übersicht über Ergebnisse einiger Arbeiten aus den botanischen Anstalten der Universität Breslau. *Maschinenschriftlich*.
- [4] Fawcett, W., and Susumu Ito, 1958: Observations on the Cytoplasmic Membranes of Testicular Cells, Examined by Phase Contrast and Electron Microscopy. *J. Biophys. u. Biochem. Cytol.* 4, 135.
- [5] Fetzmann, E. L., 1958: Über rotierende Eigenbewegung der Zellkerne und Plastiden bei *Chara foetida*. *Protoplasma* 49, 549.
- [6] Härtel, O., 1951: Die Stachelkugeln von *Nitella*. *Protoplasma* 40, 526.
- [7] Heitz, E., 1932: Die Herkunft der Chromozentren. *Planta* 18, 571.
- [8] Höfler, K., 1957: Mikrosomen und Meiosomen. *Protoplasma* 48, 167.
- [9] — 1958: Permeabilität und Plasmabau. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 72, 236.
- [10] — und W. Url, 1958: Das Verhalten der Chondriosomen bei Kappenplasmolyse. *Protoplasma* 49, 307.
- [11] Jarosch, R., 1955: Untersuchungen über Plasmaströmung. Dissertation, Wien.
- [12] — 1956: Plasmaströmung und Chloroplastenrotation bei Characeen. *Phyton (Argentina)* 6, 87.
- [13] — 1958: Die Protoplasmafibrillen der Characeen. *Protoplasma* 50, 93.
- [14] — Die Dynamik im Characeen-Protoplasma. *Phyton (Argentina)* (im Druck).
- [15] Johow, F., 1881: Die Zellkerne von *Chara foetida*. *Bot. Ztg.* 39, 729.
- [16] Kisser, J., 1922: Amitose, Fragmentation und Vakuolisierung pflanzlicher Zellkerne. S. B. Wien. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. 131, Abt. 1, 105.
- [17] Klemm, P., 1895: Desorganisationserscheinungen der Zelle. *Jb. wiss. Bot.* 28, 627.
- [18] Linsbauer, K., 1927: Über eigenartige Zellkerne in *Chara-Rhizoiden*. *Österr. bot. Z.* 76, 249.
- [19] Menke, W., 1959: Myelinfiguren im Cytoplasma meristematischer Zellen. *Protoplasma* 51, 127.

- [20] Mirande, M., 1919: Sur le chondriome les chloroplastes et les corpuscules nucléolaires du protoplasme des *Chara*. C. r. acad. sci. Paris 168, 283.
- [21] Nichols, S. P., 1925: The effect of wound upon the rotation of the protoplasm in the internodes of *Nitella*. Bull. Torrey Bot. Club 52, 351.
- [22] Péterfi, T., und G. Yamaha, 1931: Die Wirkung des mechanischen Druckes auf das Protoplasma der *Nitella*-Zelle. Protoplasma 12, 279.
- [23] Perner, E. S., 1953: Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. Protoplasma 42, 457.
- [24] — 1957: Zum elektronenmikroskopischen Nachweis des „Golgi-Apparates“ in Zellen höherer Pflanzen. Naturwiss. 44, 336.
- [25] — und G. Pfefferkorn, 1953: Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop unter Berücksichtigung ihrer morphologischen Veränderung bei der Isolierung. Flora 140, 98.
- [26] Pfeiffer, H., 1953: Veränderungen des Strömungsdichroismus an Protoplasmasträngen pflanzlicher Dauerzellen. Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 2.
- [27] Pringsheim, N., 1881: Über Lichtwirkung und Chlorophyllfunktion in der Pflanze. Jb. wiss. Bot. 12, 288.
- [28] Revel, J. P., Susumu Ito, and Don W. Fawcett, 1958: Eleytron Micrographs of Myelin Figures of Phospholipide Simulating Intracellular Membranes. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 4, 495.
- [29] Sitte, P., 1957: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an meristematischen Pflanzenzellen. Experientia 13, 419.
- [30] — 1958: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse. Protoplasma 49, 447.
- [31] Steiner, M., 1954: Hinweise auf eine Längsverdoppelung von Mitochondrien bei *Oospora lactis*. Naturwiss. 41, 191.
- [32] Strugger, S., 1929: Untersuchungen an isolierten Kernen der Internodialzellen von *Chara fragilis*. Planta 8, 717.
- [33] Url, W., 1959: Phasenoptische Untersuchungen an Fruchtfleischzellen von *Symphoricarpus racemosus* Hooker. Protoplasma 51, 399.
- [34] Walther, E., 1929: Entwicklungsgeschichtliche und zytologische Untersuchungen an einigen Nitellen. Dissertation, Zürich.
- [35] Yotsuyanagi, Y., 1953: Recherches sur les Phénomènes moteurs dans les Fragments de Protoplasme isolés. II. Divers mouvements déterminés par la condition de milieu. Cytologia 18, 202.
- [36] Zacharias, E., 1902: Über die „achromatischen“ Bestandteile des Zellkernes. Ber. dtsh. bot. Ges. 20, 298.

Photosynthesis of *Helodea canadensis* after Vital Staining with Rhodamine B

By

J. Zurzycki and W. Starzecki

Department of Plant Physiology University of Cracow and Laboratory of Plant Physiology Polish Academy of Sciences

With 22 Figures

(Received March 18, 1960)

Introduction

As a vital stain selectively absorbed in chloroplasts rhodamine B was used for the first time by Strugger (1936/37 a and b) who in his experiments observed the manner in which rhodamine is accumulated in tissues and its influence on photosynthesis. Using the method of bubble counting he found that in the first half hour after staining photosynthesis was slightly intensified but later for the next few hours of staining the rate of photosynthesis was lower than in the controls. Contrarily to these results Pirson and Alberts (1941) found that in isolated leaves of *Helodea* photosynthesis measured with Warburg's method was stopped completely or almost completely after 60–120 minutes of treatment with rhodamine. Pirson and Alberts supposed that Strugger's measurements were influenced by photosynthesis proceeding in unstained leaves or parts of leaves, but that the chloroplasts which had absorbed the dye were no longer capable of assimilation. Recently Lindner (1959), however, reported that chloroplasts stained with rhodamine and then treated with a solution of nicotine were vacuolized after exposure to light. This means that such chloroplasts did not lose the ability to photosynthesis even after 10 hours of staining.

The nicotine test gives only qualitative results and in view of the low accuracy of the bubble counting method (Górski 1930, 1935) no reliable quantitative data can be obtained with it. Nevertheless, both methods show that, contrarily to what was reported by Pirson and Alberts, chloroplasts retain photosynthetic abilities after staining with rhodamine.

In connection with these contradictory results a new investigation of the problem has been thought useful. Thus the aim of this investigation has been to measure the rate of photosynthesis in isolated leaves of *Helodea* stained with rhodamine B. Photosynthesis was measured by the respirometric method (Zurzycki 1955 a), which made possible measurements of the gaseous exchange in a definite section of a leaf with the simultaneous control of the degree of staining. In the course of measurements the leaves were submerged in water or in a solution of the stain and did not contact directly with the buffer, as would be the case with Warburg's method.

Material and Methods

For experiments plants of *Helodea canadensis* grown in an aquarium were used. All the measurements were carried out on young but fully developed leaves cut off from the shoot 6–10 cm. from the apex. The

leaves were cut from the shoot about 12 hours before an experiment started and in the meanwhile were kept in tap water.

Observations were made with a Lumipan microscope equipped with 40 \times and 90 \times objective lenses. For measurements a 15 \times eyepiece was used. The equipment for photographing was a green filter (Schott VG 5,2 mm.) or an interference filter with the maximum transmittance at 557 m μ .

Light absorption in solutions and in stained leaves

was measured with an Uvispek (Hilger) spectrophotometer. For measurements of light absorption in leaves Shibata's opal plate method (Shibata, Benson and Calvin 1954, Shibata 1958) was used. Light absorption in chloroplasts and vacuoles was measured by defining the local densities on microphotographs of cells after exposing plates to 557 m μ light. The local density of negatives was defined in an enlarger adapted for use as a microdensitometer and coupled with a photomultiplier (Walker 1958); the projections being magnified 2300 \times . The optical density of negatives was measured in a field corresponding to a section 2 μ in diameter of the microscopic preparation. To define light absorption in a chloroplast the density of the film at the centre of the chloroplast was compared with the density of two or three similar areas in its direct vicinity regarded as the "background" (Fig. 1). Light absorption in vacuoles was calculated from densito-

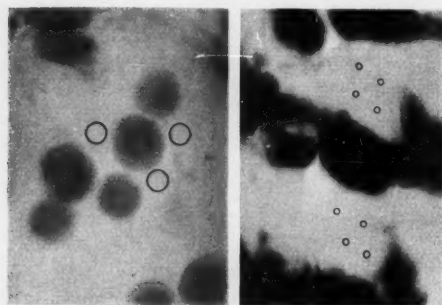


Fig. 1. Microphotographs made at the 557 m μ wave length such as were used for densitometric measurements. The density of plate was measured with a microdensitometer for the areas marked by circles.

metric measurements for several points of each cell carried out after the chloroplasts had been centrifuged away and by comparing these measurements with densitometric measurements of the preparation outside the leaf. Extinctions were calculated from the difference of the measured density in the sections of the leaf and in the background using densitometric curves for the plates used in making photographs.

Measurements of photosynthesis were carried out in a capillary respirometer (Zurzycki 1955 a and b) modified so that it incorporated four chambers (Starzecki, in press). The active cross-section area of the capillaries was 0.0182 mm^2 . The lighting equipment of the respirometer is shown in Fig. 2. Heat filters consisted of a ferrous ammonium sulphate solution (70 g./litre) in a layer 5 cm. thick for white light and for interference filters of more than $480 \text{ m}\mu$ or of a CuSO_4 solution (10 g./litre) for interference filters of less than $480 \text{ m}\mu$. To obtain monochromatic light line interference filters (Schott SIF) with maxima at 400, 442, 482, 523, 557, 602, 642, $682 \text{ m}\mu$ were used. Light intensity was measured on the plane of the chambers using in the case of white light a photoelement and were recorded in luxes. In the case of coloured light, a Kipp thermopile was used and light intensities were then recorded in ergs per cm^2 and sec. Measurements of the gaseous exchange were made at the temperature of 22°C . Each measurements of photosynthesis or respiration consisted of 5-6 recordings of the production or consumption of oxygen repeated at 5 minute intervals during half an hour.

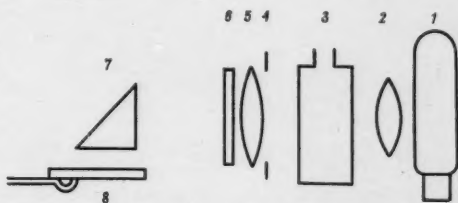


Fig. 2. The optical system of the respirometer. 1 projector lamp of 250 W, 2 and 5 lenses. 3 liquid filter, 4 diaphragm, 6 interference filter, 7 prism, 8 reaction chambers of respirometer.

Results

Staining

The concentration of the dye used for staining was basically the same as the concentration in Strugger's experiments, i.e. $1:1000$ ($= 2.08 \times 10^{-3} \text{ M}$). Fig. 3 illustrates the absorption of light in a layer one cm. thick of this solution according to spectrophotometric measurements. To bring out more forcibly the absorption of light in the short-wave range both the extinction and the logarithms of extinction in the solution have been plotted. As is to be seen from the curves light absorption in the solution is strongest for wave lengths of 500 to $580 \text{ m}\mu$. In the short-wave range absorption is much weaker and for wave lengths of more than $610 \text{ m}\mu$ it drops almost to naught.

The colour of *Helodea* leaves changed to dirty green already a few minutes after they had been placed in the $1:1000$ solution of rhodamine.

After one hour in the solution the red tint became much deeper and after several hours the leaves assumed a dark red colour. The changes in the

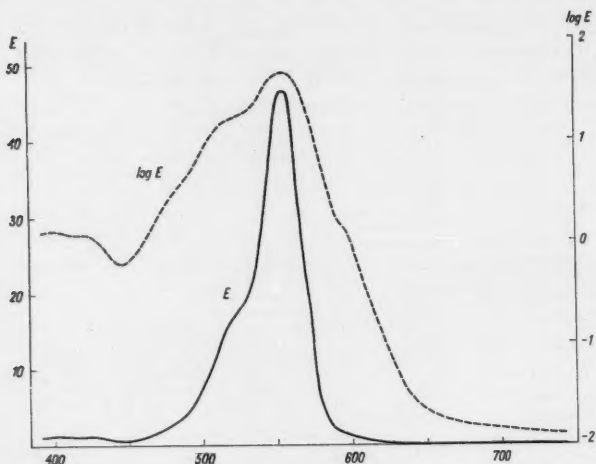


Fig. 3. Optical properties of a 1 cm. layer of the 1:1000 rhodamine B solution. Curve 1—extinction (left scale), curve 2—logarithms of extinction (right scale).

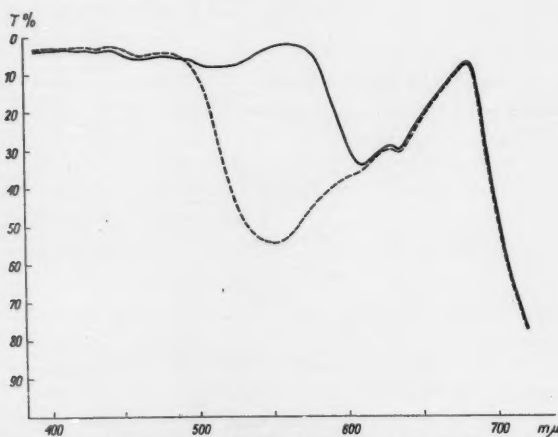


Fig. 4. Optical transmittance of a *Helodea canadensis* leaf before staining (dotted line) and after staining for one hour in the 1:1000 rhodamine B solution (solid line). x-axis—wave length, y-axis—transmittance.

spectral transmittance of leaves before staining and after one hour of staining are shown in Fig. 4. As is to be seen from these curves the change of absorption was insignificant for blue and red light, whereas for wave

lengths 500 to 600 $m\mu$ absorption sharply increased with a well marked peak at 557 $m\mu$, similarly as in the water solution of rhodamine. The slight increase of transmittance in the short-wave range was probably due to changes in the position of chloroplasts during staining, but this point will be dealt with more fully further on. Since the peak of light absorbed by the dye taken in by leaves was not shifted, the difference between the extinction at the wave length of 557 $m\mu$ before and after staining was assumed in further determinations as the measure of the amount of the dye taken in by leaves. Determinations made on this assumption (Fig. 5) indicate that the dye was taken in very rapidly during the first hour of staining and then gradually more and more slowly during the next several hours. However, even in the tenth hour of staining a rise in the level of the dye in leaves was still noticeable. In leaves transferred after various times of staining to tap water changed every 30 minutes the dye was washed out. The process on the whole proceeded more rapidly in leaves more strongly stained, but even in leaves stained for a very short time (e. g. 10 minutes) traces of rhodamine could be detected spectroscopically after many hours of washing in clean water.

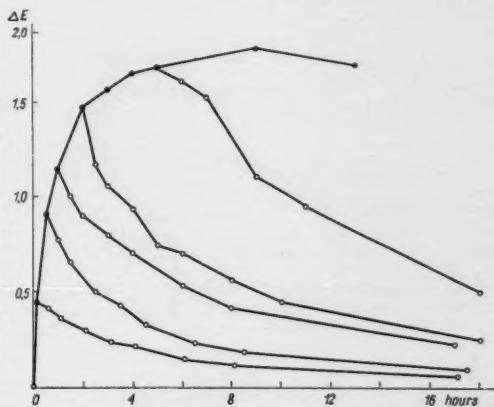


Fig. 5. Changes of extinction at the 557 $m\mu$ wave length during staining in the 1:1000 rhodamine B solution and after placing in water. x-axis—time in hours, y-axis—changes of extinction. Each point corresponds to the average value of measurements made on three leaves. The leaves cut off from one branch.

For comparative measurements of photosynthesis it is necessary to maintain the concentration of the dye in leaves at more or less unchanged level, but this was obtained neither by keeping leaves in the staining solution for a long time nor by transferring stained leaves to clean tap water. Another attempt at stabilizing the rhodamine concentration consisted in transferring leaves after one hour of staining in the 1:1000 solution to solutions of various concentrations. The changes of extinction in these tests (Fig. 6) indicated that the dye was still taken in when leaves were transferred to concentrations of 1:2000 or more, whereas at concentrations of 1:5000 and less the amount of the dye in leaf tissue decreased. In leaves transferred to concentrations of 1:3000 or 1:4000 extinction was maintained at a more or less constant level. On the basis of these results the following procedure

was accepted for staining in further experiments: after one hour of staining in the 1:1000 rhodamine solution leaves were transferred to the 1:4000 solution. In this way during at least 2 to 12 hours after staining had started the total amount of the dye in leaves remained constant at the level corresponding to the rise of light extinction in leaves at the $557\text{ m}\mu$ wave length by about 1.0.

In the course of experiments on the rate of photosynthesis it was found necessary to use also leaves stained in much weaker concentrations. Analogically as has described above it was found that in leaves stained for

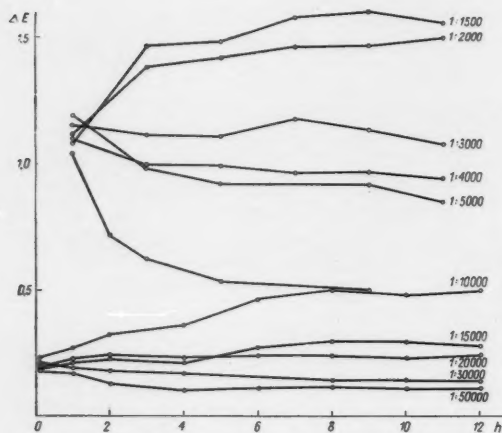


Fig. 6.

Fig. 6. Changes of extinction at the $557\text{ m}\mu$ wave length in leaves stained for one hour (upper family of curves) and for 5 minutes (lower family of curves) in the 1:1000 rhodamine solution and then transferred to solutions of various concentrations. The figures marking the curves indicate the concentration in the second stage of staining. Other details as in Fig. 5.

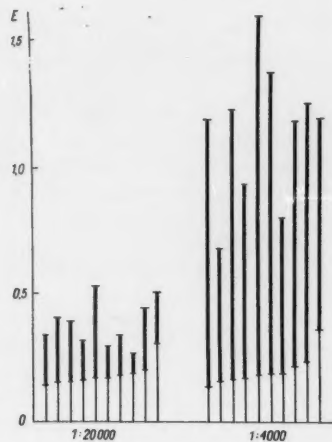


Fig. 7.

Fig. 7. Variability of the staining ability of 10 leaves cut off from different branches and stained according to the 1:1000 \rightarrow 1:20,000 and 1:4000 systems. Thin line—extinction in unstained leaves, heavy line—the increase of extinction.

5 minutes in the 1:1000 solution and then transferred to the concentration of 1:20,000 the amount of the dye taken in by leaves was maintained at a constant level corresponding to the rise of light extinction at the $557\text{ m}\mu$ wave length by about 0.2 (Fig. 6).

Individual differences in the staining capacity were manifested even by leaves isolated from neighbouring nodes of one branch. These differences became more pronounced when the staining capacity of leaves from various shoots were compared. Since for measurements of photosynthesis leaves from various branches were used the variability in the amount of the dye

taken in by 10 leaves was examined. It was found that the individual variability in the increase of extinction in stained leaves was rather wide (Fig. 7) and in no way associated with the extinction of unstained leaves.

Microscopic examinations of changes occurring in cells during staining fully confirmed the effects observed by Strugger (1936/37 a and b) and Lindner (1959). During the first 5 to 15 minutes of staining the grana of chloroplasts in the upper cell layer of leaves were stained selectively, then as more of the staining solution was taken in the limits of the grana became obliterated. During the first hour of staining the dye was rapidly accumulated in chloroplasts and their outlines became somewhat rounded

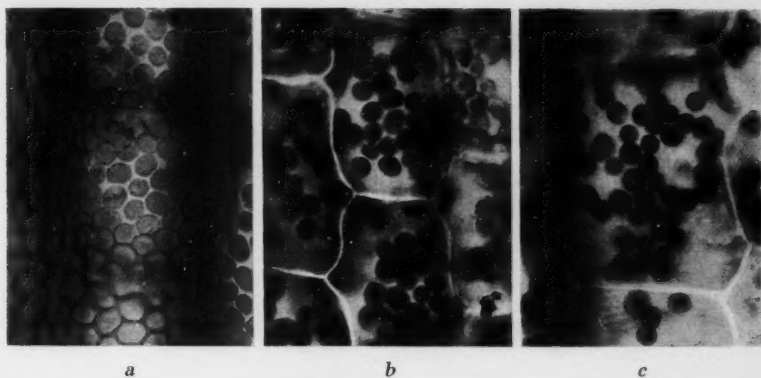


Fig. 8. Changes of the shape and the arrangement of chloroplasts from the top side of a leaf stained in the 1:1000 solution, a before staining, b 1 hour, c 8 hours after staining.

off. The mosaic formed by chloroplasts in the upper layer of cells before staining (Fig. 8a) disappeared, the arrangement of chloroplasts was less compact with empty spaces appearing between them and sometimes some chloroplasts partly overlapping. The loosening of the chloroplast arrangement proceed and more chloroplasts overlapped in the further hours of staining. After 4 hours the first bowl shaped chloroplasts described by Lindner appeared. At first such chloroplasts were few, but after 6 to 8 hours about half of the chloroplasts were bowl-shaped, and after 10 to 12 hours all chloroplasts assumed that shape (Fig. 8c). In leaves stained for 15 to 20 hours some chloroplasts were shaped in the form of very deep bowls, while others were flattened and in the form of polygons. In this last case the plastids were crowded into larger groups pressed flat on the cell walls and formed mosaics in which no chloroplasts ever overlapped; moreover fusions and bridges were frequent between these chloroplasts, especially in the later stages. Contrarily to the homogeneous structure of the bowl-shaped chloroplasts the structure of the flattened polygonal chloroplasts was distinctly granular. The sequence of changes taking place in the shape

of chloroplasts during staining is shown in Fig. 9. Measurements of the average diameter and thickness of 50 chloroplasts (Fig. 10) showed that during the first hour of staining the diameter of chloroplasts slightly diminished and their thickness increased. Later, when bowls had formed,

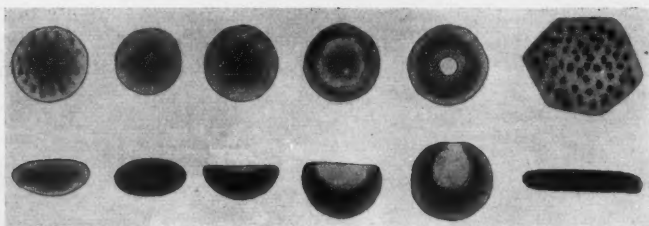


Fig. 9. Schematic diagram showing how the shape of chloroplasts changes during staining.

the diameter of bowls did not decrease but their thickness diminished. Thus, the formation of bowls probably consisted in the flattening of chlo-

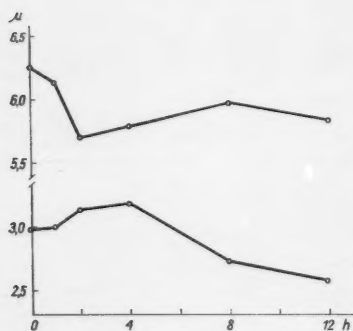


Fig. 10.

Fig. 10. Average dimensions of chloroplasts during staining in the 1:1000 solution. Every point corresponds to the average of 50 measurements. x-axis—time in hours, y-axis—diameter and thickness of chloroplasts in μ .

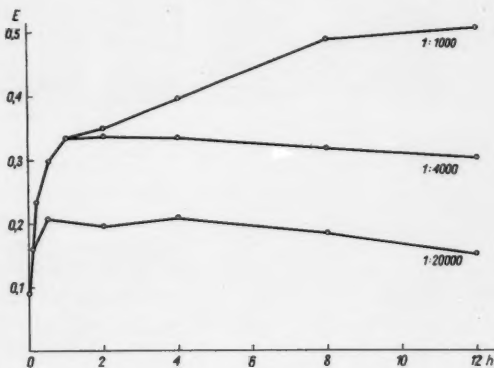


Fig. 11.

Fig. 11. Changes of the average extinction in chloroplasts at the 556 $m\mu$ wave length after staining according to the 1:1000, 1:1000 \rightarrow 1:4000, and 1:1000 \rightarrow 1:20000 systems. x-axis—time in hours, y-axis—average extinction. Every point corresponds to the average of 15–20 densitometric measurements.

replants most strongly in their thickest central part with the rim showing a tendency to shrink.

In chloroplasts of the under side of leaves the changes were similar but

slower. The chloroplasts usually retained their rather compact arrangement for 8 to 15 hours of staining. The first bowls did not appear till after 6 to 8 hours. After 15 to 20 hours only $\frac{1}{4}$ of chloroplasts had assumed the bowl shape, though they were still much less concave than on the upper surface. The flat polygonal chloroplasts were not observed even after 20 hours of staining.

The method of staining first in the 1:1000 and then in the 1:4000 solution slowed down considerably the changes taking place during many hours of staining in the 1:1000 solution. The chloroplasts retained their typical shape and the somewhat dispersed arrangement for many hours without any changes. The first slightly concave bowl-shaped chloroplasts in cells of the upper side appeared after 15 to 20 hours of staining, on the under side no bowl-shaped chloroplasts were found.

Staining in 1:1000 and 1:20,000 solutions produced no significant changes in the shape and arrangement of chloroplasts, except for slightly rounded off outlines. Traces of the mosaic arrangement were still visible after 12 hours of staining.

Microscopic examinations showed that the dye was taken in first by chloroplasts, though cell sap also assumed a pink hue. Because of this it seemed useful to define the amount of the dye accumulated both in the chloroplasts and in the vacuoles. The necessary measurements were carried out with the densitometric method on microphotographs of cells. Extinction in chloroplasts at the 557 m μ wave length (Fig. 11) was about 0.09 and rose in the course of staining rapidly at first then more slowly, but a rise of extinction was noticeable all the time even after 12 hours of staining. The total average rise of extinction amounted to 0.41. When leaves were transferred after one hour from the 1:1000 solution to the 1:4000 solution extinction was stabilized at a more or less constant level with a slight downward trend. The average increase of extinction during 2 to 8 hours of staining amounted 0.327. In leaves transferred after 5 minutes of staining to the 1:20,000 solution extinction in chloroplasts rose during the next 50 minutes and then stabilized at the level of about 0.2. Since the average thickness of chloroplasts was known from measurements, it was easy to calculate the concentration of the dye in chloroplasts (Table 1).

The data in the table indicate that the concentration of rhodamine in chloroplasts was rather high. Assuming that the concentration of chlorophyll was about 6 per cent (Euler, Bergmann, Hellstrom 1934) the concentration of rhodamine in chloroplasts must have been about $\frac{1}{3}$ of the chlorophyll concentration for the 1:1000 1:4000 staining system and about $\frac{1}{8}$ for the 1:1000 \rightarrow 1:20,000 staining system.

The taking-in and the stabilization at a constant level of rhodamine in the vacuoles was more rapid. In the 1:1000 solution the state of equilibrium was reached after about 2 hours (Fig. 12). When leaves were transferred after one hour to the 1:4000 solution the concentration of rhodamine in vacuoles dropped and extinction became stabilized at 1.3 to 1.4. The effect was similar in the 1:1000 \rightarrow 1:20,000 staining system when extinc-

tion became stabilized at 0,28 to 0,34. Since the thickness of leaves was known to be about 40μ the concentration of the dye in cell sap could be calculated (Table 1).

The curves in Fig. 11 and 12 indicate that the response of vacuoles to any changes in the concentration of rhodamine was much more rapid than of chloroplasts. A change in the total light absorption by leaves was the

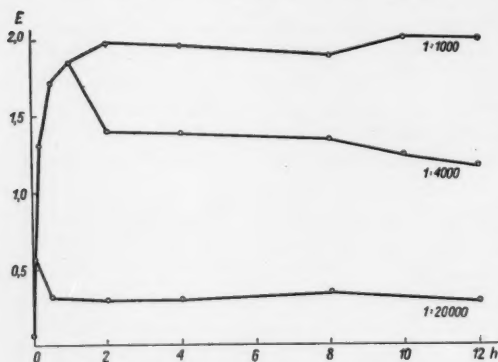


Fig. 12. Changes of the average extinction in vacuoles at the $557\text{ m}\mu$ length. Details as in Fig. 11.

resultant of both these processes, of which absorption by chloroplasts played the dominant part. When the curves in Figs. 6 and 12 are compared it is to be seen that the marked drop of extinction in cell sap one hour after leaves had been placed in the 1:4000 solution corresponded to only slight drop of the increase of the total extinction in leaves. Although the concentration of rhodamine in cell sap

was lower than in chloroplasts it was sufficient to weaken considerably the light transmitted through leaves, especially when the wave length of trans-

Table 1. The average concentration of rhodamine in chloroplasts and vacuoles for different staining procedures.

System and time of staining	Chloroplasts			Vacuoles		
	increment of extinction	thickness in μ	concentration in %	increment of extinction	thickness in μ	concentration in %
Solution 1:1000, 12 hours of staining ..	0,41	2,56	3,43	1,94	40	1,04
Solutions 1:1000 \rightarrow 1:4000						
Average between 2nd and 8th hour of staining ..	0,237	2,87	1,78	1,312	40	0,71
Solutions 1:1000 \rightarrow 1:20.000						
Average between 2nd and 8th hour of staining ..	0,108	2,95	0,79	0,249	40	0,13

mitted light approached the absorption maximum of rhodamine. E. g. when the concentration of rhodamine in vacuoles was 0,71 per cent light at the $557\text{ m}\mu$ wave length was weakened to $\frac{1}{3}$ of its original intensity by passing through a layer of cell sap 15μ thick.

Photosynthesis

Measurements of photosynthesis were carried out on fragments of leaves 5–6 mm. long cut off 12 hours before an experiment. The fragments were placed in the respirometer in such a way that light reached them from the under side of leaves. Preliminary measurement were carried out in white light using a projector lamp supplied with 200 V current and a heat filter consisting of ferrous ammonium sulphate solution. The light curve of photosynthesis for two fragments of leaves is shown in Fig. 13. The curve indicates that the saturation point was reached when light intensity was about 6000 luxes. Further measurements were carried out in white light

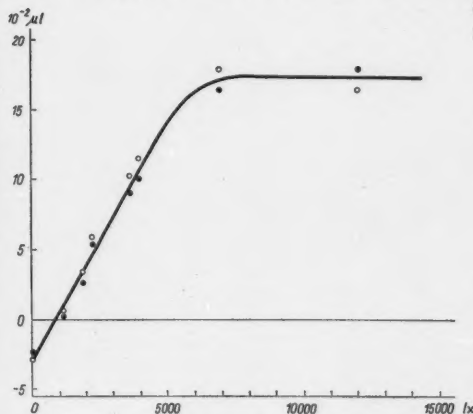


Fig. 14.

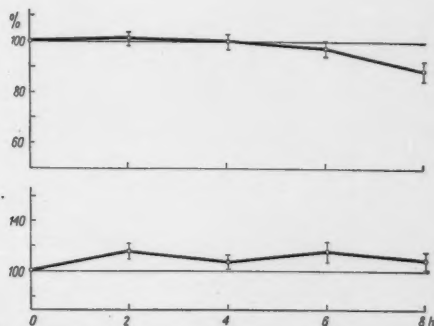


Fig. 13.

Fig. 13. The light curve of photosynthesis of leaves in *Helodea canadensis*. x-axis—intensity of light in luxes, y-axis—production and consumption of oxygen in μl .

Fig. 14. Changes of photosynthesis and respiration in unstained leaves during 8 hours. Upper curve—true photosynthesis in light of 2500 luxes, lower curve—respiration. x-axis—time in hours, y-axis—photosynthesis and respiration in percentages of the first measurement assumed as 100 per cent. Each point corresponds to the average of 5 measurements.

of two intensities: in weak light of 2500 luxes causing production of oxygen about twice the consumption during respiration; and in strong light of 25,000 luxes exceeding three times light intensity at the saturation point. The first question for investigation was the manner in which photosynthesis changed in the course of staining. For this purpose the rate of respiration and photosynthesis of unstained leaves was measured and then the leaves were taken out of the respirometer chambers, stained, and again placed in the respirometer for further respiration and photosynthesis measurements repeated every two hours during 8 hours. The measurements of photosynthesis were carried out in weak light. Control measurements on unstained leaves (Fig. 14) indicated that the rate of true photosynthesis did not change during 6 hours of experiments, while at the same time the rate

of respiration increased insignificantly (by about 10 per cent). Leaves stained in the 1 : 1000 solution displayed a marked steady drop of the rate of true photosynthesis (Fig. 15), so that after 8 hours the rate of photosynthesis was on the average 20 per cent of the assimilation before staining and in some case dropped to nought. Simultaneously the rate of respiration rose steadily, so that after 8 hours it was on the average 170 per cent as compared to controls, and in some cases could be even 300 per cent and more as compared to controls.

Staining with the 1 : 1000 \rightarrow 1 : 4000 system reduced the rate of photosynthesis by about 10 per cent (Fig. 16). This lower ability for photosynthesis was not further reduced and remained more or less stable during

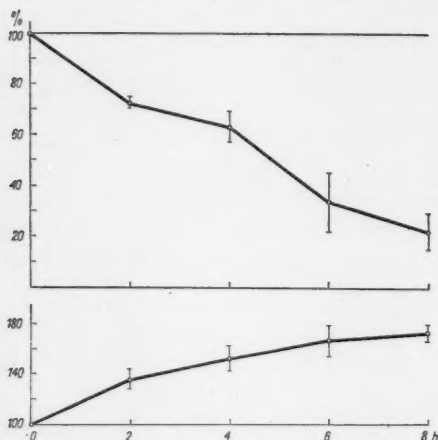


Fig. 15.



Fig. 16.

Fig. 15. Changes of photosynthesis and respiration in leaves stained in the 1 : 1000 solution of rhodamine during 8 hours. x-axis—time in hours, y-axis—photosynthesis and respiration in percentages of measurements before staining. White light of 2500 luxes. Each point corresponds to the average of 6 measurements.

Fig. 16. Changes of photosynthesis and respiration in leaves stained with rhodamine, first for 1 hour in the 1 : 1000 concentration and then in the 1 : 4000 concentration. Details as in Fig. 15.

6–8 hours after staining. At the same time the rate of respiration manifested a steady upward tendency. Staining according to the 1 : 1000 \rightarrow 1 : 20,000 system enhanced the ability for photosynthesis (Fig. 17), so that it surpassed the assimilation from before staining by 9 to 14 per cent, while the rate of respiration increased only slightly similarly as in controls.

The above results show that staining for many hours in the 1 : 1000 solution damaged the cells, which manifested by the much enhanced respiration and the steady drop of the ability for assimilation. When the results of the photosynthesis measurements are compared with the cytological examinations it is to be seen that the bowl-shaped chloroplasts lost completely or almost completely their ability for photosynthesis. Since in the

1:1000 rhodamine solution the conditions were never stabilized and the concentration of the dye in chloroplasts as well as their structure changed constantly further experiments were centred on the other two staining systems. With both these systems true photosynthesis was stabilized and was maintained at a constant level during 2-6 hours after staining. In the 1:1000 \rightarrow 1:4000 staining system the rate of photosynthesis was lower than before staining. The drop could have been caused by two factors, either the apparatus of assimilation was damaged by the dye or the dye acted as a filter reducing light intensity so much that in weak light the rate of photosynthesis was affected (cf. Fig. 13). To check which of these suppositions was correct two experiments were carried out. Measurements

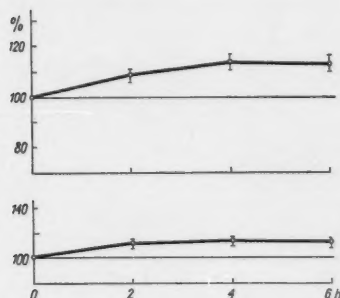


Fig. 17.

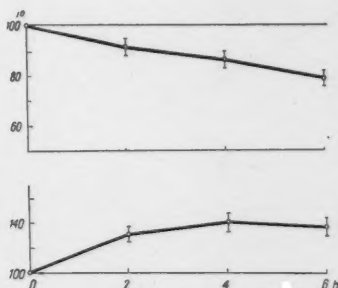


Fig. 18.

Fig. 17. Changes of photosynthesis and respiration in leaves stained with rhodamine first for 5 minutes in the 1:1000 concentration and then in the 1:20,000 concentration. Details as in Fig. 15.

Fig. 18. Changes of photosynthesis and respiration in unstained leaves during 8 hours of exposure to light of 25,000 luxes. Details as in Fig. 14.

of the photosynthesis rate were made in light so strong that even if its intensity was very much weakened the rate of assimilation would not be affected. In the other experiments photosynthesis was measured in red light for wave lengths not absorbed by rhodamine.

Strong light, however, causes a steady drop in the rate of photosynthesis even in unstained leaves (Fig. 18). The intensities used here were probably so high that they could damage the cells, which effect was manifested in the first place by the smaller ability for assimilation, similarly as in the case of *Lemna trisulca* (Zurzycki 1957). In stained leaves the destructive effect of light was even greater (Fig. 19) and rapidly reduced the ability for photosynthesis with a simultaneous rise in the rate of respiration. Thus, measurements of photosynthesis in strong light would not give an answer to the question which of the two alternatives was responsible for the reduced rate of photosynthesis in stained leaves. However, the question was solved unequivocally by measurements of the rate of

photosynthesis in red light using a red filter (Schott RG 2, 2 mm.) transmitting wave lengths of more than $620\text{ m}\mu$, i. e. in the range not absorbed by rhodamine. In spite of this the rate of photosynthesis was 15 to 20 per cent lower than in the controls (Fig. 20). This means that even staining with the $1:1000 \rightarrow 1:4000$ system had a damaging effect on the apparatus of photosynthesis. The weakened ability for photosynthesis could not, thus, be explained by the lower intensity of light, which after being absorbed by the dye, only partly reached the chloroplasts.

In this connection it is very interesting that in red light photosynthesis was weakened somewhat more than in white light, though a great part of incident white light was absorbed by the dye. Probably, in spite of its damaging effect on the apparatus of photosynthesis, rhodamine acted to

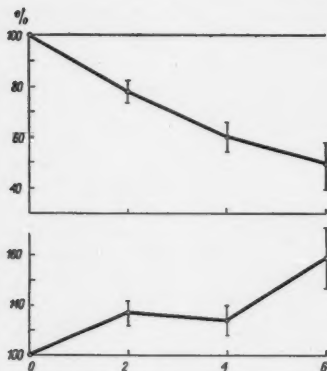


Fig. 19.

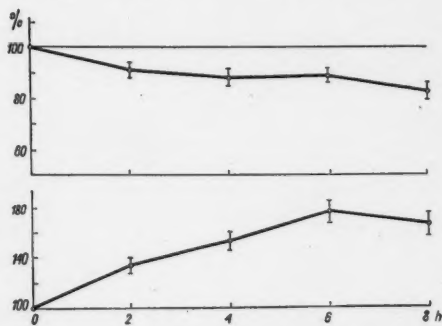


Fig. 20.

Fig. 19. Changes of photosynthesis and respiration in leaves stained for 1 hour in the $1:1000$ concentration and then in the $1:4000$ concentration. Photosynthesis was measured in light of $25,000$ luxes. Details as in Fig. 15.

Fig. 20. Changes of photosynthesis and respiration in leaves stained for 1 hour in the $1:1000$ concentration and then in the $1:4000$ solution. Photosynthesis was measured in weak light using the RG 2 red filter. Details as in Fig. 15.

some extent as a sensitizer of photosynthesis. This supposition was confirmed by the results obtained with the $1:1000 \rightarrow 1:20,000$ staining system, since a significant rise in the ability for photosynthesis, as compared with the rate of photosynthesis before staining was observed. To elucidate this problem the rate of photosynthesis was measured in monochromatic light of different wave lengths. For each wave length the rate of photosynthesis was measured twice once before a leaf was stained and again after staining the intensity of light being the same in both cases. The intensity of coloured light obtained by the use of interference filters corresponded to the intensity of weak white light, i. e. to the light intensity bringing out apparent photosynthesis 1–2 times higher than the rate of respiration. The light intensities, calculated in ergs per square centimetre per second ranged,

according to the photosynthetic activeness of the particular wave lengths, from 780 at 440 $m\mu$ to 3075 at 557 $m\mu$. At 400 $m\mu$ the highest light intensity that could be obtained was only sufficient to bring out photosynthesis at a rate close to the compensation point so that the error of measurements in light of this wave length is greatest. The rate of true photosynthesis of stained leaves in coloured light are shown in Figs. 21 and 22 in percentages of the rate of photosynthesis before staining (assumed as 100 per cent). After staining with the 1:1000 \rightarrow 1:4000 system the rate of photosynthesis in light of long wave lengths not absorbed by rhodamine was reduced by about 15 per cent, which confirmed the results obtained with the RG 2 filter.

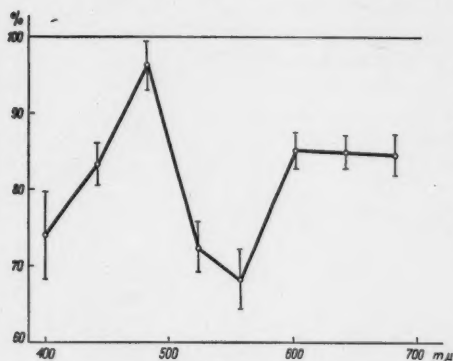


Fig. 21.

Fig. 21. Changes of the rate of true photosynthesis in light of different wave lengths in leaves stained for 1 hour in the 1:1000 solution and then in the 1:4000 solution. x-axis—wave length, y-axis—rate of photosynthesis calculated as the percentage of photosynthesis before staining measured in light of the same intensity. Each point corresponds to the average of 10–12 measurements. The dashes mark the mean error.

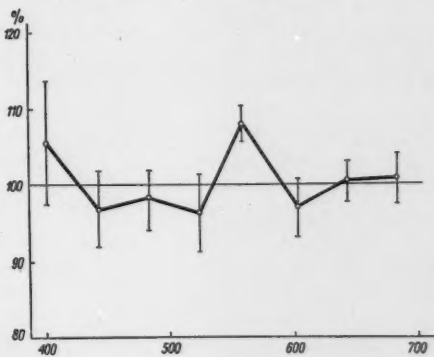


Fig. 22.

Fig. 22. Changes of the rate of true photosynthesis in light of different wave lengths in leaves stained for 5 minutes in the 1:1000 solution and then in the 1:20,000 solution. Details as in Fig. 21.

In the range of wave lengths corresponding to the maximum absorption of rhodamine the drop in the rate of photosynthesis was about 30 per cent greater, whereas at 480 $m\mu$ the drop in the rate of photosynthesis was smallest. In a few of the measurements carried out in light of wave lengths 480, 523 and 557 $m\mu$ the rate of photosynthesis was found to be more than 100 per cent. In the 557 $m\mu$ wave length range light intensity was very strongly weakened by absorption and approximate calculations indicated that the drop in the rate of photosynthesis should have been greater if rhodamine behaved merely as an inactive light absorbing filter. The supposition thus arose that light absorbed by rhodamine could have been utilized at least to some extent, for photosynthesis. Since the sensibilizing effect was most strongly manifested for the wave length of 480 $m\mu$ —i. e.,

when light absorption by rhodamine was relatively weak—and in a few measurements in wave lengths of 527 and 557 $m\mu$ —which might have been associated with the weaker staining of some particular leaves (cf. Fig. 7)—measurements were also made for the third already mentioned system of staining. The amount of rhodamine taken in by leaves in staining with the 1:1000 \rightarrow 1:20,000 system were constant but much lower than in the case of the other staining procedures. The changes in the rate of true photosynthesis in light of different wave lengths after staining according to this third system are shown in Fig. 22. As is to be seen from this graph no significant changes in the rate of photosynthesis occurred in the long and short wave-length ranges, but the rate of photosynthesis increased by about 8 per cent in the 557 $m\mu$ wave length range, i. e. at the wave length corresponding to the maximum absorption of rhodamine.

Observations of photosynthesis in leaves stained with the 1:1000 \rightarrow 1:4000 and 1:1000 \rightarrow 20,000 systems indicated that the rate of photosynthesis in white light was higher than in light of long-wave lengths not absorbed by rhodamine. It was 90 and 95 per cent respectively in strongly stained leaves and 112 and 100 per cent respectively in weakly stained leaves. The comparison of these results with the spectral curves of photosynthesis and an analysis of the distributions of light energy in the spectrum of the incandescent lamp lead to the conclusion that more intense photosynthesis in white light was not caused solely by the higher rate of photosynthesis at the wave lengths of 482 $m\mu$ (Fig. 21) and 557 $m\mu$ (Fig. 22). It seems that white light because it is composed of different wave lengths, acted more effectively on cells than light of only one wave length. An attempt to explain this phenomenon will be made in the discussion of the results reported here.

Discussion

In his experiments Strugger (1936/37 a) used the method of counting bubbles which is not very accurate. This method as applied to stained leaves of *Helodea*, was critically analysed by Pirson and Alberts (1941). In spite of this the results obtained by Strugger have some similarity to the results here reported. E. g. the rise in the rate of photosynthesis after 25 and 55 minutes of staining (Strugger 1936/37 a, Table 1) and its drop after 3 to 4 hours of staining (Table 2) correspond in a way to the enhanced photosynthesis in low accumulations of the dye (Fig. 17) and the weakened photosynthesis in high accumulations of the dye (Fig. 15). In this investigation the drop of photosynthesis was somewhat greater, which might have been associated as is stressed by Pirson and Alberts, with the fact that Strugger used for his measurements whole branches so that some of his leaves could have been partly or whole unstained. The rapid and complete inhibition after 1 to 2 hours of staining reported by Pirson and Alberts (1941) can be explained not only by the harmful effect of rhodamine in the concentration of 1:1000 but also by the effect of the very strong light (12,000 luxes) used by those workers. The present results indicate that very strong light has a harmful effect

even on unstained leaves and that in stained leaves the damage caused by strong light are enhanced, though in the same leaves in weak light photosynthesis is stabilized. Moreover, Pirson and Alberts disregarded changes in the rate of respiration occurring in the course of staining. The present measurements show that respiration changes significantly and its rate rise considerably so that the drop of the rate of apparent photosynthesis is much greater than of true photosynthesis.

It has now been demonstrated that the effect of rhodamine, at least in the 1 : 1000 concentration, is not harmless as was believed by Strugger. After prolonged staining in the 1 : 1000 solution of rhodamine leaf cells are visibly damaged, which is manifested by a higher rate of respiration and a marked drop of the ability for photosynthesis. On the other hand, when small amounts of the dye are taken in by leaves the injuries of the apparatus of photosynthesis are only partial or even in no way affect its activeness. Moreover, rhodamine taken in by leaves in small amounts may act as a sensitizer of photosynthesis transferring at least part of the absorbed energy to the apparatus of photosynthesis. A similar sensitizing effect was observed by Metzner (1952) in the reduction of silver nitrate by chloroplasts stained with rhodamine but only in the short-wave range. It seems that the mechanism underlying the transfer of energy absorbed in rhodamine may be twofold: (a) either by the direct resonance transfer of energy from the excited molecules of rhodamine to the molecules of chlorophyll, or (b) by fluorescence.

The resonance transfer of energy between the molecules of a dye and chlorophyll a was reported in the case of various photosynthetic pigments. One of the conditions for such a transfer to be possible is the small distance between the two reacting molecules. It seems that in the case of chloroplasts stained with rhodamine this condition is fulfilled, since rhodamine is a lipophil dye and is thus mainly accumulated in the grana (Strugger 1936/37 b) where chlorophyll is also present. Finally the resonance transfer of energy from the molecules of rhodamine to molecules of another dye was demonstrated in vitro systems described by Brown (1951).

The transfer of energy by fluorescence is possible because rhodamine is a dye manifesting this ability. The range of the light spectrum of fluorescence for rhodamine is 550 to 700 m μ with the maximum at 605 m μ (Pringsheim 1949) which corresponds to the range of strong absorption by chlorophyll. Therefore, the energy absorbed by rhodamine and emitted subsequently in the form of fluorescence can be absorbed by chlorophyll. The distribution of rhodamine molecules in the close vicinity of chlorophyll favours such a utilization of fluorescence radiation. In the case of rhodamine the fluorescence yield may be rather high, especially in the lipid environment. The absolute fluorescence yields of rhodamine B at room temperature reported by Pringsheim (1949) are as follows: 25 per cent in water, 42 per cent in ethanol, and 70 per cent in glycerine. It is probable that in the lipid phase of a chloroplast where rhodamine is accumulated the fluorescence yield is high.

The data available at present are insufficient to decide which of these two possibilities is actually involved in the transfer of energy. On the whole the opinion prevails that it is the latter one.

The higher photosynthesis rate of stained leaves in white light than would result from the sum of the photosynthesis rates in monochromatic light seems to be due to the difference in the distribution of the gradient of light intensity within a leaf. Light of wave lengths strongly absorbed by chloroplasts is greatly weakened already by the first layer of chloroplasts so that when it reaches the deeper layers of a leaf its intensity is much reduced. When measurements are made in light of wave lengths not so strongly absorbed the gradient of intensity is not very steep, but also the intensity of photosynthesis is lower. In the case of white light composed of all wave lengths the part of radiation most strongly absorbed by chloroplasts is utilized for photosynthesis first of all by the first layer of chloroplasts. Thus, light penetrating the deeper layers of a leaf is not strongly absorbed by chloroplasts but is strongly absorbed by rhodamine. In this way the chloroplasts from the deeper layers can make use of the energy transferred by the dye.

Summary

1. Leaves of *Helodea canadensis* placed in the 1 : 1000 solution of rhodamine B accumulate the dye for at least 12 hours. The concentration of rhodamine reached after this time is 3.5 per cent in chloroplasts and 1 per cent in cell sap. The inertia with regard to the accumulation of the dye is greater in chloroplasts than in the vacuole.

2. When leaves are stained first for a relatively short time in the 1 : 1000 solution of rhodamine and then placed in a more dilute solution the conditions can be so adjusted that the amount of the dye taken in remains constant for a long time.

3. In leaves stained in the 1 : 1000 solution the ability for photosynthesis is steadily reduced and disappears completely after 8 to 12 hours. At the same time the rate of respiration increases.

4. When the amount of the dye taken in by leaves is small the rate of photosynthesis remains constant for many hours at a level higher or lower than in unstained leaves according to the amount of the dye accumulated in leaves.

5. Measurements of the rate of photosynthesis in monochromatic light indicate that light energy absorbed by rhodamine can be partly transferred to the photosynthetic system.

References

- Bower, E. J., 1951: Resonance transfer of energy between molecules. In Symp. Soc. Exp. Biol. V, 152—159. Univ. Press Cambridge.
- Euler, H., B. Bergmann, and H. Hellstrom, 1934: Über das Verhältnis von Chloroplastenzahl und Chlorophyllkonzentration bei *Elodea densa*. Ber. dtsh. bot. Ges. 52, 458—462.

- Górski, F., 1930: Sur la précision de la méthode de la numération des bulles dans les recherches de photosynthèse. Bull. Acad. Polon. Sci. et Lettr., Serie B, 1—37.
- 1935: Gas interchange in aquatic plants during photosynthesis. Bull. Acad. Polon. Sci. et Lettr., Serie B, 177—198.
- Lindner, H., 1959: Die lichtabhängige Vakuolisierung der Chloroplasten in Nikotinlösungen. I. Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Reversibilität. Protoplasma 51, 91—111.
- Metzner, H., 1952: Untersuchungen zur Silbernitratreduktion durch vitalgefärbte Chloroplasten. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl., II b, Nr. 1, 1—5.
- Pirson, A., and F. Alberts, 1941: Über die Assimilation von *Helodea*-Blättchen nach Vitalfärbung mit Rhodamin B. Protoplasma 35, 131—136.
- Pringsheim, P., 1949: Fluorescence and Phosphorescence. Intersc. Publ. Inc., New York.
- Shibata, K., A. Benson, and M. Calvin, 1954: The adsorption spectra of suspensions of living micro-organisms. Biochem. Biophys. Acta 15, 461—470.
- Shibata, K., 1958: Spectrophotometry of intact biological materials. Absolute and relative measurements of their transmission, reflection and adsorption spectra. Journ. Biochem. 45, 599—623.
- Starzecki, W., 1960: A modified microrespirometer and its application for photosynthesis measurement of large blade leaves. Acta Soc. Bot. Pol. (in press).
- Strugger, S., 1936/37 a: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. Flora 31, 113—128.
- 1936/37 b: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. Flora 31, 324—340.
- Walker, P. W. B., 1958: Ultraviolet microspectrophotometry. In General Cytochemical Methods. Ed. by J. F. Danielli, 163—217. Acad. Press Inc., New York.
- Zurzycki, J., 1955 a: A micromethod for measuring photosynthesis. Experientia 11, 261.
- 1955 b: Chloroplast arrangement as a factor in photosynthesis. Acta Soc. Bot. Pol. 24, 27—63.
- 1957: The destructive effect of intense light on the photosynthetic apparatus. Acta Soc. Bot. Pol. 26, 157—175.

Dynamics of Morphogenetic Fields¹

By

Singo Nakazawa

Biology Department, Yamagata University, Yamagata, Japan

With 1 Text-Figure

(Received March 22, 1960)

The morphogenetic field theory has been developed by Gurwitsch (1922, 1927, etc.), Weiss (1925, 1950, etc.), and by others. According to them, a specific differentiation takes place in the specific morphogenetic field. However, because of the obscurity of the definition of the field, its importance has not always been accepted generally till the present day. Nevertheless, it seems worthwhile to clarify scientific meaning of the morphogenetic fields for understanding the fundamental mechanism of differentiation. Herein, the present writer designed a physical consideration.

Prior to the actual differentiation of a certain organ, a special substance indispensable for that differentiation is localized to the presumptive site where that organ is to be formed. Such a substance is called here the "morphogenetic substance" as was introduced by Hämmerling (1934). For instance, a peculiar cytoplasm originated from the nucleus can be detected at the apex of the young *Acetabularia* stem before forming the cap (Hämmerling 1934, Werz 1959). When the isolated cell of *Cladophora* is cultured in a medium containing P^{32} or S^{35} , the radioactivity, appearing uniformly at the beginning, becomes restricted to the basal region before actual occurrence of the regulation, indicating that the incorporated radioactive substance is localized in time (Schoser 1956). Site of the rhizoid formation, in fern prothallium, can be distinguished by detecting localization of the metallophilic cytoplasm (Nakazawa and Tsusaka 1959 a, b; Nakazawa 1960 a). Formation of scutellar bristles of *Drosophila* is preceded by each prepattern localizing peculiar cytoplasm (Stern 1957). Here, what is important is the fact that the localization is caused by an active transport resisting the diffusion. This polar movement of the morphogenetic substance can be formulated as follows.

¹ Dedicated to Dr. Paul Weiss for his merits in the field theory of morphogenesis.

In the system in which a substance is uniformly distributed without any concentration gradient, the distance Δx a particle of that substance can be transported in time t is described with Einstein's equation:

$$\Delta x = \pm \sqrt{2Dt},$$

in which D represents the diffusion constant. In other words, the direction, $+$ or $-$, is not definite, i.e. there are no particular tendencies in direction toward which the particle is selectively movable. However, the circumstance is different in morphogenetic fields. That is, as above mentioned, there the morphogenetic substance is actively transported to the peculiar region where a certain organ is to be formed. In other words, the movement of morphogenetic substances is controlled by something like "Maxwell's demon." So that Einstein's equation cannot be applied to the morphogenetic field. In this case, let the possible force driving a given particle, at a given locus, be denoted by radius vector \mathbf{r} , then integrate it over the surface S of the sphere drawn by \mathbf{r} , and let the surface integral be represented by vector \mathbf{P} as follows.

$$\int_S \mathbf{r} ds = \mathbf{P}.$$

Now, if $\mathbf{P} = 0$, it indicates that strength of the possible force to drive the particle is equal toward any direction, so that the particle is movable in any direction at equal speed (Fig. 1A). Therefore, statistically, concentration gradients cannot be induced in this system, Einstein's equation fits well, so that there is no morphogenetic field. Different from this, if $\mathbf{P} \neq 0$, it indicates that the possible force is larger towards the direction of \mathbf{P} and smaller in the opposite (Fig. 1B). So that, statistically, particles are liable to be selectively moved towards \mathbf{P} direction. As to a single particle, though it can be driven toward any direction at one chance of movement by heat movement or by Brownian motion, repeating its movement at every chance, statistically, it also tends in time to be transported towards \mathbf{P} direction. Hence, \mathbf{P} stands for the morphogenetic field at a given locus of the organic body. Therefore, it is a vector field.

Driven by the morphogenetic field, there appear concentration gradients of the morphogenetic substance resulting in the localization. The gradient tends to diminish by diffusion. Actually, however, the gradients must develop in time or at least be kept constant resisting diffusion for inducing the localization of morphogenetic substances. Therefore, the movement for setting up localization must be greater than and in opposite direction to the diffusion. According to Fick's law of diffusion,

$$dm = -Dq \frac{dc}{dx} dt,$$

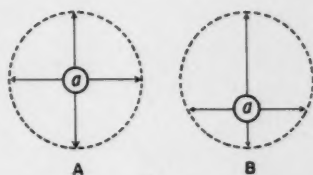


Fig. 1. A, particle (a) of the morphogenetic substance in the non-field space, where the possible force (arrowed) to drive the particle is of equal strength towards any direction. B, particle (a) under the morphogenetic field, where the possible force is stronger towards a certain direction.

when dc/dx denotes concentration gradient, D diffusion constant, q a plane crossing perpendicularly the axis of gradient, and dm amount of the substance transported from a site of the higher concentration to the lower across plane q during time dt . Upon the course of localization of a morphogenetic substance, the movement against diffusion must always be greater than the diffusion. Therefore, when dm' represents the movement of a morphogenetic substance across plane q in dt in the same sense as above, the direction of the movement must be in opposite to that of diffusion, so that,

$$dm' = -Dq \frac{dc}{dx} dt + Dq \frac{dc}{dx} dt \cdot X,$$

$$\text{i.e.} \quad dm' = -(1-X) \cdot Dq \frac{dc}{dx} dt$$

$$\text{and} \quad X > 1.$$

Here, X is the factor that makes dm' surpass the diffusion. Therefore, it also represents the morphogenetic field.

Hence, $X \equiv P$ when P is scalar of \mathbf{P} , therefore $|P| > 1$ when the value of driving force of the diffusion is one. If the primary system is completely homogeneous so that without any concentration gradient, $dc/dx = 0$. Therefore, $dm' = 0$. That is, active transport of morphogenetic substances cannot take place under such conditions. Actually, however, it seems true that small labile concentration gradients are always fluctuating by chance at small regions by heat movement of molecules, and it causes the start of polar transportation above mentioned.

As the morphogenetic field \mathbf{P} is a position vector,

$$\text{rot } \mathbf{P} = 0$$

therefore, let scalar point-function of the morphogenetic field be denoted by $\Phi(x, y, z)$, then

$$\mathbf{P} = -\nabla \Phi$$

That is, the morphogenetic field has a potential. It may well be called the "morphogenetic potential." This idea is in conformity with the potential theory of morphogenesis elaborated by Yamada (1940).

Empirically, the morphogenetic field is a function of positions. For instance, when a germ cell is reared after its intracellular materials, possibly including morphogenetic substances, were artificially localized by means of centrifuging, usually the determinant substances are once dispersed to an almost uniform system, and then are *de novo* localized to each region, so that mere centrifugation cannot modify the patterns of differentiation as was experimented in sea urchin eggs (Motomura 1949), some fucoid eggs (Nakazawa 1959), fern spores (Mosebach 1943, Nakazawa 1957), and so on. These verify that the morphogenetic field that bears a certain organ is not determined by mere accumulation of substances, but rather the substances are distributed according to fields that are characterized by position.

Hence, generally, the fact that the pattern of differentiation is determined by the site can be understood to a certain extent. The idea of pre-pattern introduced by Stern (1957) seems to be a result of accumulation of critical substances according to the morphogenetic field. The localization of special cytoplasm in *Acetabularia* at each small region, exhibiting pre-patterns corresponding to each radius of the cap (Werz 1959), indicates that the strength and the direction of each field are characterized by position. Really, the gene is responsible for production of morphogenetic substances, but their localization is controlled otherwise as was stated by Danielli (1958). As to the nature of the morphogenetic field, the writer is of the opinion that it must be attributed to the protoplasmic polarity (Nakazawa 1960 b).

Summary

Let vector **P** denote the morphogenetic field at a given site of an organic body, then it is defined as

$$\mathbf{P} = \int_S \mathbf{r} ds$$

in which radius vector **r** represents the possible force to drive a particle of the morphogenetic substance and *ds* element of the surface *S* of the sphere drawn by radius *r*. So that the particle set in the morphogenetic field would tend to be driven in time to the direction of the field resulting in polar localization of the morphogenetic substance. The morphogenetic field has a morphogenetic potential.

References

- Danielli, J. F., 1958: Studies of inheritance in amoebae by the technique of nuclear transfer. *Proc. Roy. Soc. London B*, **148**, 321—331.
- Gurwitsch, A., 1922: Über den Begriff des Embryonalen Feldes. *Arch. Entw.-mechan.* **51**, 383—415.
- 1927: Weiterbildung und Verallgemeinerung des Feldbegriffes. *Ibid.* **112**, 433—454.
- Hämmerling, J., 1934: Über formbildende Substanzen bei *Acetabularia mediterranea*, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. *Ibid.* **131**, 1—81.
- Mosebach, G., 1943: Die Polarisierung der *Equisetum*-Spore durch Licht. *Planta* **33**, 340—387.
- Motomura, I., 1949: Artificial alteration of the embryonic axis in the centrifuged eggs of sea urchins. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.*, 4th Ser. **18**, 117—125.
- Nakazawa, S., 1957: Centrifugación de esporas de *Equisetum*. *Anal. Inst. Biol. Univ. Mexico* **28**, 11—15.
- 1959: General mechanism of the polarity determination in some fucoid eggs. *Naturwiss.* **46**, 333—334.
- 1960 a: Morphogenesis of the fern protonema III. Differentiation of the "metalophilic cytoplasm" in *Equisetum*. *Phyton (Argentina)* **14**, 37—41.
- 1960 b: Nature of the protoplasmic polarity. *Protoplasma* **52**, 274—294.

- Nakazawa, S., and A. Tsusaka, 1959 a: Appearance of "metallophilic cytoplasm" as a prepattern to the differentiation of rhizoid in fern protonema. *Cytologia* 24, 378—388.
- — 1959 b: Special cytoplasm detectable in fern rhizoids. *Naturwiss.* 46, 609—610.
- Schoser, G., 1956: Über die Regeneration bei den Cladophoraceen. *Protoplasma* 47, 103—134.
- Stern, C., 1957: The role of genes in differentiation. *Cytologia Suppl.* 70—72.
- Weiss, P., 1925: Unabhängigkeit der Extremitätenregeneration vom Skelett (bei *Triton cristatus*). *Arch. Entw.mechan.* 104, 339—394.
- 1950: Perspectives in the field of morphogenesis. *Quart. Rev. Biol.* 25, 177—198.
- Werz, G., 1959: Über polare Plasmaunterschiede bei *Acetabularia*. *Planta* 53, 502—521.
- Yamada, T., 1940: Beeinflussung der Differenzierungsleistung des isolierten Mesoderms von Molchkeimen durch zugefügtes Chorda- und Neuralmaterial. *Folia Anat. Japon.* 19, 131—197.

Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amoebe *Chaos chaos* L.

I. Der Einfluß des pH des Medium auf das bewegungs- physiologische Verhalten von *Chaos chaos* L.

Von

Werner Käppner

Aus dem Institut für Kinematische Zellforschung der Universität Frankfurt a. Main

Mit 25 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. März 1960)

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	81
Material und Methode	83
A. Vorversuche	84
1. Einfluß der Temperatur	84
2. Einfluß des Lichtes	85
3. Einfluß des osmotischen Wertes	86
B. Einfluß des pH des Medium auf das Verhalten	88
1. Änderung des pH durch HCl	88
2. Änderung des pH durch HNO ₃	91
3. Änderung des pH durch H ₂ SO ₄	93
4. Änderung des pH durch Ameisensäure (HCOOH)	94
5. Änderung des pH durch Oxalsäure (COOH) ₂	95
6. Änderung des pH durch Asparagin (Asparaginsäureamid)	96
7. Änderung des pH durch Essigsäure (CH ₃ COOH)	97
C. Analysen einiger Bewegungsvorgänge im Zeitrafferlaufbild	98
D. Besprechung der Ergebnisse	100
E. Zusammenfassung der Ergebnisse	104
Literatur	105

Einleitung

Die Ursachen der amoeboiden Bewegung sind trotz vieler Bemühungen noch immer ungeklärt. Das Auffallendste bei der Beobachtung einer sich amoeboid bewegenden Zelle ist das Fehlen einer festen Gestalt und offenbar

jeglicher Koordination der Bewegung. Die einzelnen Bewegungsphasen laufen relativ langsam ab und entziehen sich so in ihrer Gesamtheit der Beobachtung. Sie können jedoch durch Zeitraffer-Filmaufnahmen erfasst und dann ausgewertet werden (Teilbild-Analyse).

Die amoeboide Bewegung läßt sich am besten an solchen Amöben untersuchen, die sich nach dem „Limax-Typ“ bewegen: *Amoeba limax* kriecht auf der Unterlage ohne Ausbildung von Seitenpseudopodien. Im normalen Medium wird nur ein Pseudopodium in der Bewegungsrichtung ausgeschickt. *Amoeba limax* ist jedoch relativ klein; die größeren Amöben bewegen sich meist nicht nach diesem Bewegungstyp, d. h. sie bilden häufig mehrere und verzweigte Pseudopodien aus.

Es war nun auffällig, daß Amöben, die in moorigen, d. h. relativ sauren Gewässern gefunden wurden, sich häufig nach dem „Limax-Typ“ bewegten, und es lag der Gedanke nahe, daß die Acidität des Wassers der gemeinsame Faktor für die gleiche Bewegungsform bei verschiedenen Amöbenarten ist.

Um diese Frage zu klären, wurde das bewegungsphysiologische Verhalten der Amöben, in diesem Falle das der Amöbe *Chaos chaos* L. in Abhängigkeit vom pH des Medium untersucht.

Über das Verhalten von Amöben in Säuren und Basen gibt es zahlreiche Arbeiten. Meist wurden jedoch die reinen Säuren und Basen angewandt und ihr Einfluß isoliert betrachtet. Genaue pH-Angaben in diesem Zusammenhang liegen selten vor. Der Einfluß des pH des Medium auf das Bewegungsverhalten der Amöben wurde nur am Rande gestreift im Zusammenhang mit Untersuchungen über Lokomotion und Wachstum (Taylor 1924 und Hopkins 1926), Geschwindigkeit der Fortbewegung (Pantin 1927), Wachstumsbedingungen (Mast 1928), Salzdurchlässigkeit (Chalkley und Daniel 1933), Verhalten der Zellmembran (Spek und Gillissen 1942).

Das Verhalten der Amöben läßt sich wie folgt gruppieren:

1. Nach der Form: Polypodiale Form: Außer dem physiologischen Hinterende ist mehr als ein Pseudopodium vorhanden.

Monopodiale Form: Außer dem physiologischen Hinterende wird nur ein Pseudopodium ausgebildet, in das die gesamte Masse des Cytoplasma hineinfließt (Limax-Typ).

Abgekugelte Gestalt: Die Amöbe hat die Form einer Kugel angenommen.

2. Nach der Beweglichkeit:

Beweglich: Protoplasma-Strömung im Innern, Ausbildung von Pseudopodien.

Unbeweglich: Die Amöbe verharrt in ihrem jeweiligen Zustand.

3. Nach der Art der Anheftung an der Unterlage:

Gute Haftung: Die Amöben „kleben“ an der Unterlage, bei Ausbildung von Pseudopodien kann es zu Ortsveränderung kommen.

Keine Haftung: Die Amöben „kleben“ nicht an der Unterlage; bei Ausbildung von Pseudopodien erfolgt keine Ortsveränderung.

Die wechselnde Anheftung an die Unterlage erlaubt nicht, die Geschwin-

digkeit und den zurückgelegten Weg als Kriterium für die Aktivität der Amöben zu verwenden. Umgekehrt kann man den Verlauf der Weg-Zeit-Kurve nicht als Kriterium für die Größe der Anheftung nehmen, weil die Aktivität noch von anderen Faktoren (Temperatur, Nahrungszufuhr etc.) beeinflusst wird.

Auffällig im Verhalten der Amöben ist der Übergang von der poly-podialen in die monopodiale Form.

Nach Edwards (1924) wird die monopodiale Form durch Neutralsalze induziert. *Amoeba proteus* wird nach Edwards in $n/500$ KCl immer monopodial (innerhalb weniger Stunden). *Chaos chaos* war auch nach 4 Tagen in $n/500$ KCl noch polypodial und gut beweglich. Dies zeigt auch, daß man *A. proteus* nicht ohne weiteres mit *Chaos chaos* vergleichen kann. Allerdings machte Edwards keine Angaben über den CO_2 -Gehalt seiner Lösungen bzw. über das pH.

Material und Methode

Chaos chaos L. = *Pelomyxa carolinensis* Wilson.

Sämtliche Untersuchungen wurden an der *Amoeba Chaos chaos* L. ausgeführt. *Chaos chaos* ist eine vielkernige Amöbe (bis zu 200 Kerne), vermutlich die größte aller Süßwasser-Amöben. Man kann zwei Typen unterscheiden:

Typ A (nach Schaeffer) mit scheibenförmigen Kernen,

Typ B mit breit-ellipsoiden Kernen.

Die Kerne des Typ A sollen größer sein als die des Typ B. Die im folgenden untersuchten Amöben gehören dem Typ B an (ellipsoide Kerne). Sie stammen aus der Zucht des Carlsberg Laboratorium in Kopenhagen, dem ich an dieser Stelle für die Überlassung der Amöben meinen Dank sagen möchte. Die Amöben werden dort seit 1938 kultiviert. Andersen (1942) hat über die Morphologie eingehende Angaben gemacht. Er unterscheidet:

1. Plasmasol: Das zentral fließende, verflüssigte Cytoplasma mit seinen Einschlüssen.
2. Plasmagel: Der ruhende verfestigte Teil des Cytoplasmas, ebenfalls mit Einschlüssen.
3. Hyalines Cytoplasma: Der Teil des Cytoplasma, der direkt an das Plasmalemma grenzt, frei von Einschlüssen.
4. Plasmalemma: Äußerste Schicht.

Zucht der Amöben

Die Amöben werden in Kristallisierschalen von 5 cm Durchmesser mit Deckel kultiviert. Als Zuchtmedium hat sich eine Kulturlösung nach Pringsheim gut bewährt (Pringsheim-Lösung). Sie hat folgende Zusammensetzung:

0,20 g	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
0,02 g	MgSO_4
0,02 g	K_2HPO_4
0,02 g	NaCl
0,002 g	FeSO_4 in 1000 ccm Aqua bidest.

Die Zuchtschälchen werden bei 20–22° C im Brutschrank gehalten. Die Amöben lassen sich jedoch auch bei gleichbleibenden Zimmertemperaturen außerhalb des Brutschrankes züchten. Man gibt als Futter Paramecien, Stentor, Rotatorien. Zur Vermehrung der Ciliaten und Rotatorien gibt man ein paar Reiskörner und einige kurze Grashalme dazu. In diesen Kulturen vermehren sich die Amöben etwa 3–4 Wochen lang.

Nach dieser Zeit müssen die Kulturen erneuert werden. Man erreicht eine längere Lebensdauer der Kulturen durch Zusatz aktiver Kohle. Die Anwesenheit von Grünalgen verbessert ebenfalls die Zuchtbedingungen.

Zur Erfassung der Bewegungsvorgänge und der Formänderungen wurden die lebenden Amöben unter Änderung des Zeitfaktors durch Anwendung des Mikrozeitrafferfilms untersucht. Als Aufnahmegerät diente die Zeiss-Winkel-Mikrozeitrafferkamera. Sämtliche Aufnahmen wurden mit einer Zeitraffung auf $\frac{1}{240}$ ausgeführt. (4 Bilder pro Minute, Abstand von Aufnahme zu Aufnahme 15 sec.)

Aufnahmebedingungen

Bei allen Versuchen wurde die Pringsheim-Lösung als Medium verwandt, in den Versuchen mit abgeändertem pH der Pringsheim-Lösung entsprechende Mengen Säuren etc. zugesetzt. Vor dem Einbringen in die Versuchslösung wurden die Amöben in Pringsheim-Lösung abgespült. Das pH wurde mit einer kombinierten Glaselektrode und einem elektrischen pH-Meßgerät der Firma Metrohm gemessen. Das Gerät wurde vor jeder Messung mit einem Puffer mit bekanntem pH geeicht (Standard-Acetatlösung pH 4,62 und Phosphatpuffer 7,0). Genauigkeit $\pm 0,05$ pH. Die Amöben wurden vor dem Einstellen des pH in die Versuchslösung eingebracht, um eine nachträgliche Verdünnung und eine Änderung des pH zu vermeiden. Nach der Messung wurden die Amöben sofort mit der Versuchslösung in eine flache Glaskammer übertragen. Die Kammer wurde mit einem Deckglas verschlossen und mit Paraffin abgedichtet (Größe der Kammer: Länge: 18 mm, Breite: 13 mm, Höhe: 35 mm; Spiegelglas, mit Paraffin verkittet).

Da die Amöben bei länger dauernden Aufnahmen u. U. einem Temperaturwechsel ausgesetzt waren, wurde dieser Faktor zuerst in Vorversuchen getrennt untersucht, ebenso der Einfluß der Beleuchtung und des Helligkeitswechsels.

Da wegen des geringen Volumen der Kammer schon bei geringfügigem Verdunsten mit Konzentrationsschwankungen zu rechnen war, wurde auch der Einfluß des osmotischen Wertes des Medium bei gleichbleibendem Zusammensetzungsverhältnis untersucht. Da die Beschaffenheit der Unterlage sowie die spektrale Zusammensetzung des Lichtes gleichblieb, wurde auf die Untersuchung des Einflusses dieser Faktoren in diesem Zusammenhang verzichtet.

A. Vorversuche

1. Einfluß der Temperatur auf das Verhalten von *Chaos chaos*

Die Beobachtungskammer konnte auf einem Heiztisch erwärmt werden. Die Temperatur wurde in der Kammer in unmittelbarer Nähe der zu beobachtenden Amöbe mit einem Mikrothermoelement (Hartmann und Braun) gemessen. Dabei zeigte sich, daß bis zu einer Temperatur von 35° C noch Pseudopodien gebildet werden können. Bei 30–32° C lassen sich die Amöben längere Zeit halten, ohne daß sichtbare Schädigungen eintreten.

Bei 36° C beginnen die Amöben sich abzukugeln. Läßt man die Temperatur weiter bis auf 40° C steigen, so erfolgt nach der Abkugelung sehr rasch ein „Aufquellen“ der äußeren Schichten der Amöbe.

Der hyaline Saum hebt sich nicht gleichmäßig ab; an der Stelle, an der sich vorher das physiologische Hinterende der Amöbe befand, ist keine Abhebung zu sehen. Sie erfolgt erst später, die Stelle ist durch eine leichte Einbuchtung gut zu erkennen. Nach 3 Stunden ist an dieser Stelle eine Kontraktion eingetreten, durch die die Amöbe eine leicht V-förmige Gestalt angenommen hat (Abb. 1).

Senkt man die Temperatur dann wieder auf 22° C, so setzt nach 48 Stunden die Bewegung wieder ein. Die Amöbe bewegt sich dann aber nur noch *monopodial*.

2. Einfluß des Lichtes auf das Verhalten von *Chaos chaos* L.

Für die Zeitraffer-Filmaufnahmen gibt es zwei Möglichkeiten der Beleuchtung: 1. Dauerbeleuchtung und 2. intermittierende Beleuchtung. Bei der Dauerbeleuchtung werden die Amöben während der ganzen Dauer des Versuches gleichmäßig beleuchtet.

Bei der intermittierenden Beleuchtung wird nur während der Aufnahme eines Bildes das Licht kurz eingeschaltet und sofort wieder ausgeschaltet. Zwischen zwei Aufnahmen liegt eine Dunkelphase, d. h. die Amöben sind nur der Raumbeleuchtung ausgesetzt. Bei der Raffung auf $\frac{1}{240}$ kommt auf eine Hellphase von 2 sec eine Dunkelphase von 15 sec.

a) Verhalten bei Dauerbeleuchtung

Dauer der Aufnahme: 3 Stunden. Normales Medium (Pringsheim-Lösung, pH 7,2). Die Amöben werden von unten mit einer 100 Watt Niedervoltlampe aus 20 cm Abstand beleuchtet.

Auswertung des Zeitraffer-Laufbildes: Die Amöben bewegen sich dauernd *polypodial*, es werden nach allen Richtungen Pseudopodien ausgebildet. Die Bewegungsrichtung wechselt oft; es läßt sich keine bevorzugte Richtung feststellen. Die Lokomotion ist nicht kontinuierlich, sie setzt plötzlich aus; hierbei wird jedoch die Bildung der Pseudopodien nicht unterbrochen oder verlangsamt, d. h. die Anheftung an der Unterlage wird gelegentlich gelöst, wodurch dann trotz Ausbildung von Pseudopodien keine Ortsveränderung möglich ist.

b) Verhalten bei intermittierender Beleuchtung

Die Bewegungsweise ist im allgemeinen die gleiche wie bei Dauerbeleuchtung. Die Ortsveränderung verläuft gleichförmiger. Die Amöben bewegen sich weniger „auf der Stelle“. Die Pseudopodien sind länger und

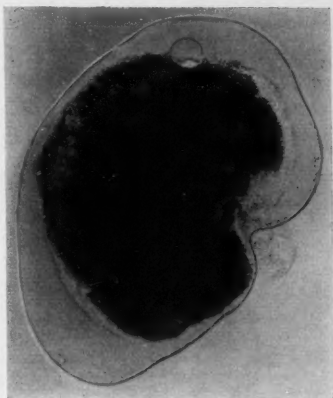


Abb. 1. *Amoeba Chaos chaos*. Normales Medium. 40° C. Abhebung der äußeren Schicht und V-förmige Kontraktion.

weisen mehr in die Bewegungsrichtung. Die Formen sind dementsprechend langgestreckter.

Temperaturmessungen ergaben, daß bei Dauerbeleuchtung sich der Inhalt der Beobachtungskammer um etwa $1,5^{\circ}\text{C}$ pro Stunde erwärmt. Bei intermittierender Beleuchtung konnte keine meßbare Temperaturerhöhung festgestellt werden. Da diese Beleuchtungsart die besten Aufnahmebedingungen bietet, erfolgen die folgenden Zeitrafferfilm-Aufnahmen mit dieser Beleuchtungstechnik.

3. Der Einfluß des osmotischen Wertes des Medium

Durch die gelegentlichen „auf der Stelle“-Bewegungen der Amöben ist eine Beurteilung des Verhaltens nach der Größe des zurückgelegten Weges

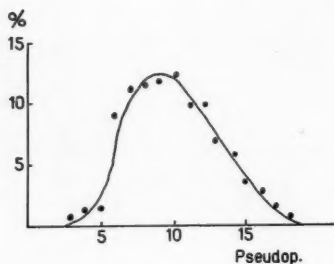


Abb. 2.

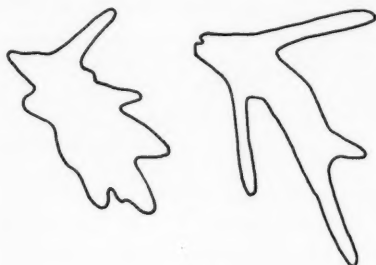


Abb. 3.

Abb. 2. Normales Medium, pH 7,2; $n = 655$. Verteilung der Anzahl der Pseudopodien.

Abb. 3. Gestalt in normalem Medium.

und nach der Geschwindigkeit nicht möglich. Die Anzahl der im Augenblick der Beobachtung bzw. der Aufnahme des einzelnen Teilbildes der Zeitraffer-Aufnahme vorhandenen Pseudopodien ist jedoch ein sicheres Kriterium. Bei der Auswertung der Mikrozeitrafferfilme wurden die Pseudopodien jeder Amöbe im Abstand von jeweils 5 Bildern = 75 sec gezählt. Da den Amöben infolge der relativ großen Höhe der Kammer genügend Raum zur Verfügung stand, so daß auch Pseudopodien senkrecht nach oben gebildet werden konnten, der Film aber nur die Projektion dieser Pseudopodien registriert, entsteht bei der Zählung ein Fehler, wenn sich auf diese Weise zwei Pseudopodien decken. Da dies jedoch recht selten der Fall ist und sämtliche Versuche mit der gleichen Technik aufgenommen und ausgewertet wurden, kann dieser Fehler vernachlässigt werden.

Die Kurve (Abb. 2) zeigt die Verteilung der Anzahl der gleichzeitig vorhandenen Pseudopodien. Abszisse: Anzahl der Pseudopodien, Ordinate: Prozentualer Anteil der Gesamtzählungen. Z. B.: 10 Pseudopodien gleichzeitig in 12,7% der Zählungen ($n = \text{Anzahl der Zählungen}$). Diese Kurve wird allen folgenden, durch experimentelle Veränderung des Medium er-

zielten Kurven als Kriterium für das bedingt als „normal“ angenommene Verhalten unterlegt.

Abb. 3 zeigt zwei Amoeben aus diesen Aufnahmen. Diese Gestalt wird als normale Form bezeichnet: polypodial, feste Anheftung, in die Hauptbewegungsrichtung zeigende lange schmale Pseudopodien.

Die Konzentration der normalen Pringsheim-Lösung ist $1,5 \cdot 10^{-3}$ M. Bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ M, der doppelten Konzentration, zeigen die Amoeben nur geringe Änderungen ihrer Gestalt (Abb. 4). Es werden lange Pseudopodien gebildet, die anfangs in die Bewegungsrichtung zeigen, später nach allen Richtungen gleichmäßig ausgebildet werden: Die zu Beginn feste Anheftung löst sich nach etwa 1 Stunde nach; die Amoeben zeigen dann nur noch geringe Ortsveränderung. Sie wird dann jedoch nicht mehr durch Fließen vollzogen, sondern durch eine Art „Stelzen“. Es scheint die Haftfähigkeit an den Spitzen der Pseudopodien am längsten gewahrt zu werden.

Erhöht man die Konzentration weiter bis auf $4,8 \cdot 10^{-2}$ M, dem 32fachen der normalen Konzentration, so zeigt sich auch jetzt keine wesentliche Änderung in der Form der Amoeben. Lediglich die Länge der Pseudopodien nimmt mit zunehmender Konzentration ab. Die Anheftung ist aufgehoben, es finden keine Ortsveränderungen mehr statt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Formen der Amoeben bei zunehmender Konzentration (Abb. 5).

Die Auszählung der Pseudopodien ergab, daß sich die Maxima der Kurven nur unwesentlich verschieben. Die Kurven sind nur steiler geworden. Es werden nie weniger als drei Pseudopodien gebildet, d. h. monopodiale Formen treten nicht auf. (Bei den monopodialen Formen wird das physiologische Hinterende als ein Pseudopodium mitgezählt,

Verdünnung man das Medium auf die Hälfte der normalen Konzentration, $0,7 \cdot 10^{-3}$ M, so zeigt sich die umgekehrte Tendenz wie in den vorausgegangenen Versuchen: Die Amoeben haften gut an der Unterlage; es erfolgt Ortsveränderung. Die Pseudopodien weisen deutlich in die Bewegungsrichtung, sie haben normale Form.

Bringt man die Amoeben in *Aqua bidest.*, so werden relativ lange Pseudopodien ausgebildet; diese haften jedoch nicht an der Unterlage, sondern werden nach allen Richtungen ausgebildet. Die Zeitraffer-Filmaufnahme wurde nach 3 Stunden unterbrochen und nach weiteren 19 Stunden fort-

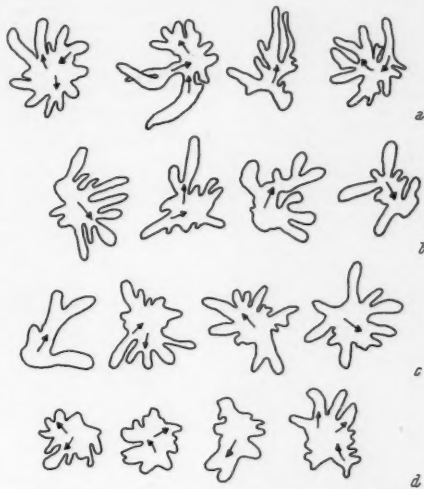


Abb. 4. Form der Amoeben in a $5 \cdot 10^{-3}$ M, b $6 \cdot 10^{-3}$ M, c $1,2 \cdot 10^{-2}$ M, d $4,8 \cdot 10^{-2}$ M. Jeweils vier verschiedene Amoeben.

gesetzt. Die Amöben blieben in der Kammer, die nicht geöffnet wurde. Nach 22 Stunden, in *Aqua bidest.*, haften sie wieder gut an der Unterlage; die Pseudopodien weisen meist in die Bewegungsrichtung, jedoch sind sie jetzt kürzer als zu Beginn des Versuches. Die Pseudopodienbildung erfolgt schneller. Die Pseudopodien werden nur für kurze Zeit ausgebildet und bald wieder eingezogen.

Die Maxima sind nach links verschoben, d. h. es werden weniger Pseudopodien gebildet (Abb. 6). Monopodiale Formen treten nicht auf.

Aus diesen Vorversuchen läßt sich der Schluß ziehen, daß durch die Bedingungen bei der Filmaufnahme, nämlich: 1. Intermittierende Beleuchtung (2 Sekunden hell, 15 Se-

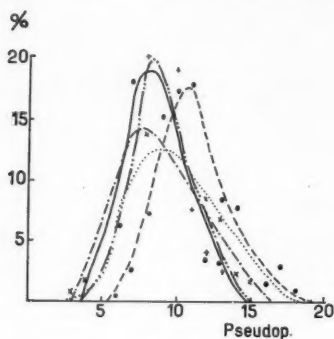


Abb. 5.

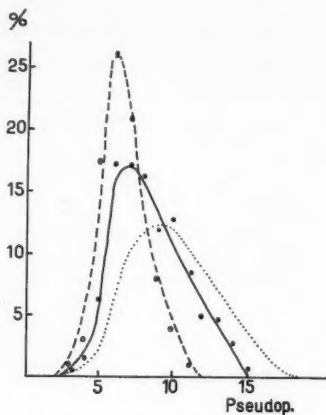


Abb. 6.

Abb. 5. Verteilung der Anzahl der Pseudopodien. ——— $5 \cdot 10^{-3}$ M, — — — $6 \cdot 10^{-3}$ M, - · - · - $1.2 \cdot 10^{-2}$ M, · · · · · $4.8 \cdot 10^{-2}$ M, Normalkurve punktiert.

Abb. 6. Verteilung der Anzahl der Pseudopodien. ——— $0.7 \cdot 10^{-3}$ M, — — — Aqua bidest., Normalkurve punktiert.

kunden dunkel), 2. Normale Lichtstärke (12 Volt, 100 Watt in 25 cm Abstand), 3. Zimmertemperatur ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) und 4. Konzentration des Medium (eventuell Schwankungen von $\pm 10\%$) keine wesentlichen Änderungen a) der Anzahl der gebildeten Pseudopodien, b) der polypodalen Form eintreten. Beeinflußt wird nur:

1. Die Intensität der Anheftung an die Unterlage und damit verbunden 2. die Richtung der Pseudopodien.

B. Einfluß des pH des Medium auf das Verhalten

1. Änderung des pH durch HCl

a) pH 6,0 (HCl)

Die Amöben bewegen sich dauernd polypodial.

Monopodiale Formen werden nicht festgestellt (Abb. 7). Bei 8 von 10 Amöben in der Kammer ist gute Anheftung und deutliche Ortsveränderung

festzustellen. Man beobachtet dementsprechend häufig langgestreckte Formen, die nur gelegentlich, bei „auf der Stelle“-Bewegungen in runde mit radiär gestellten Pseudopodien übergehen. Es besteht kein Unterschied in der Form, der Anzahl der Pseudopodien und der Bewegungsweise zwischen großen und kleinen Amöben (Volumenverhältnis 1 : 3), d. h. jüngeren und älteren Tieren.

Auch nach 24 Stunden waren im Verhalten der Amöben keine Änderungen eingetreten.

b) pH 5,0 (HCl)

Die Amöben bewegen sich nach 15 Minuten noch polypodial. Sie haften gut an der Unterlage; es tritt Ortsveränderung ein. Nach etwa $2\frac{1}{2}$ Stunden

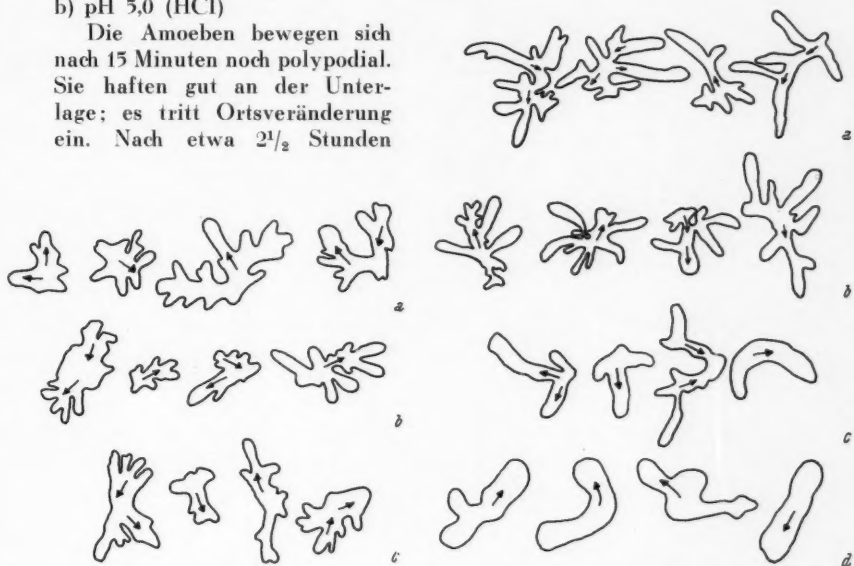


Abb. 7.

Abb. 8.

Abb. 7. Normales Medium, pH 6,0 (HCl): a Beginn des Versuches, b nach 15 Min., c nach 50 Min.

Abb. 8. Normales Medium, pH 5,0 (HCl): a Beginn des Versuches, b nach 15 Min., c nach $2\frac{1}{2}$ Std., d nach 22 Std.

werden die anfangs relativ langen Pseudopodien allmählich kürzer (Abb. 8, a—d). Die Anheftung an die Unterlage bleibt jedoch unverändert erhalten. Nach 22 Stunden zeigen von 10 Amöben 4 monopodiale Form, die aber nicht dauernd beibehalten wird: In unregelmäßigen Abständen wird ein zusätzliches Pseudopodium ausgebildet, das meist in einem Winkel von 90° zur Ausgangslage hervorkommt und in das dann das gesamte Cytoplasma wieder hineinfließt. Hierdurch wird nach kurzer Zeit die monopodiale Form wieder erreicht. Auch bei den Monopodialen bleibt die Haftfähigkeit erhalten (Abb. 8).

c) pH 4,0 (HCl)

Man sieht nur noch geringe Ortsveränderungen; die Anheftung an die Unterlage ist nur noch schwach. Die Anzahl der gebildeten Pseudopodien ist geringer geworden, es wird nur ein Pseudopodium voll ausgebildet, während die anderen kurz angelegt und bald wieder eingezogen werden (Abb. 9, a—d).

d) pH 3,5 (HCl)

Die Amöben sind zunächst polypodial, werden jedoch schon nach wenigen Minuten monopodial. Bei der Auswertung des Zeitraffer-Laufbildes fallen sofort die eigenartigen wellenförmigen Be-

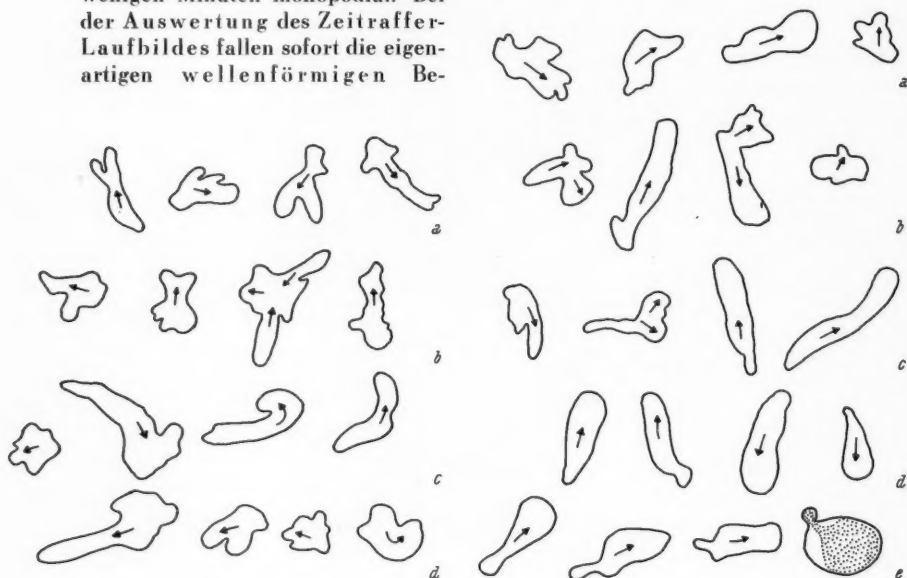


Abb. 9.

Abb. 10.

Abb. 9. Normales Medium, pH 4,0 (HCl): a Beginn des Versuches, b nach 15 Min., c nach 30 Min., d nach 24 Std.

Abb. 10. Normales Medium, pH 3,5 (HCl): a Anfang, b nach 15 Min., c nach 30 Min., d nach 1½ Std., e nach 2 Std.

wegungen auf, die vom physiologischen Vorderende nach hinten verlaufen (eine Analyse dieser Vorgänge folgt später). In den ersten 30 Minuten können noch weitere Pseudopodien gebildet werden, dann erfolgt die Bewegung nur noch monopodial. Die Anheftung ist fast völlig aufgehoben; zwei Amöben haften mit dem Hinterende an der Unterlage. Das physiologische Vorderende dieser Amöben beschreibt dann einen mehr oder minder großen Kreisbogen. Mit zunehmender Dauer des Versuches zeigt sich bei den monopodialen Amöben ein eigenartiger Vorgang: Das physiologische Hinterende, von verschiedenen Autoren als „tail“ bezeich-

net, verringert seinen Durchmesser, es „kontrahiert“ sich und setzt sich deutlich vom übrigen Teil der Amoebe ab. Dabei kann man beobachten, daß sich der „tail“ noch um etwa den gleichen Betrag in den vorderen Teil der Amoebe hinein fortsetzt. Er ist dort an der dichteren Granulation zu erkennen. Bei diesem pH werden die Tiere bald geschädigt. Vor dem Absterben kugeln sich die Amöben ab, das „Granuloplasma“ kontrahiert sich und es wird ein hyaliner Saum sichtbar. Die Zeitraffer-Filmaufnahme zeigt sehr deutlich, daß es sich hierbei nicht um ein Aufquellen der äußeren Schichten (infolge geänderter Wasserdurchlässigkeit der Membran) handelt. Der Durchmesser des abgekugelten Tieres ändert sich nicht (Abb. 10, a–e).

c) pH 3,0 (HCl)

Die Auswertung zeigt den gleichen Verlauf wie bei pH 3,5, jedoch ist der Ablauf: Polypodial > monopodial > Abkuglung > Tod sehr stark beschleunigt. Nach 45 Minuten sind alle Tiere tot.

f) pH 2,5 (HCl)

Die Auswertung des Laufbildes ergibt den gleichen Verlauf wie bei einem pH 3,5 bzw. 3,0. Nach 20 Minuten sind alle Amöben abgestorben.

Die Auszählung der Pseudopodien bei pH 7,2 (Normalkurve, punktiert) bis pH 3,5 ergibt eine zunehmende Linksverschiebung der Verteilungskurven, außerdem einen Anstieg der Maxima von pH 7,2 nach pH 3,5. Die Pseudopodien wurden 2 Stunden von Beginn des Versuches = Beginn der Zeitraffer-Filmaufnahme an gezählt. Abstand zwischen zwei Zählungen: 5 Bilder = 75 sec. In der Kammer befanden sich jeweils 10 Amöben (Abb. 11).

Die Kurve für pH 5,0 reicht nicht weit genug nach links, weil die später einsetzende Reduzierung der Pseudopodienzahl nicht mit erfaßt wurde.

2. Änderung des pH durch HNO_3

a) pH 6,0 (HNO_3)

Die Amöben verhalten sich normal. Gute Anheftung.

b) pH 5,0 (HNO_3)

Die Amöben bilden lange Pseudopodien aus. Die Anheftung ist etwas schwächer als im Normalfall (geringere Ortsveränderung). Auch nach 48 Stunden sind die Amöben noch polypodial und beweglich.

c) pH 4,0 (HNO_3)

Die Pseudopodien sind jetzt kürzer, die Anheftung ist aufgehoben; keine Ortsveränderung. Nach 24 Stunden noch polypodial.

d) pH 3,5 (HNO_3)

Die Form der Amöben ist gedrungener, keine Anheftung, keine Ortsveränderung. Einige werden nach kurzer Zeit monopodial, zeigen aber noch lebhaftere Bewegungen. Die „Wellenbewegung“ äußert sich jetzt als starke Vorwölbung senkrecht zur Bewegungsrichtung. Gelegentlich kann aus einer dieser Vorwölbungen noch ein Pseudopodium werden. Das Hinterende ist nicht so „kompakt“ wie bei den monopodialen HCl-Amöben.

Die Mehrzahl der Amöben bewegt sich jedoch polypodial. Auch nach 2×48 Stunden sind diese Amöben noch polypodial und beweglich.
e) pH 3,0 (HNO_3)

Die Pseudopodien sind nunmehr kürzer, ihre Form ist plump; sämtliche Amöben nehmen nach kurzer Zeit monopodiale Gestalt an. Ein besonders

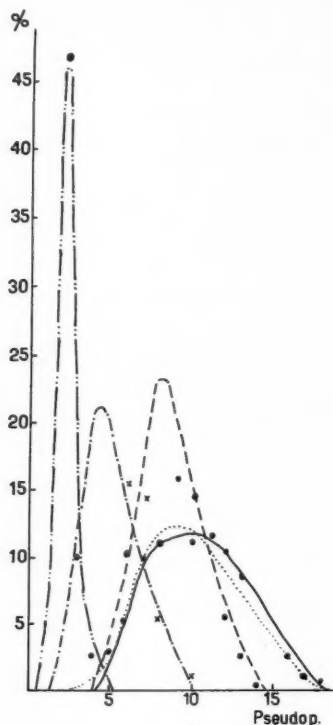


Abb. 11.

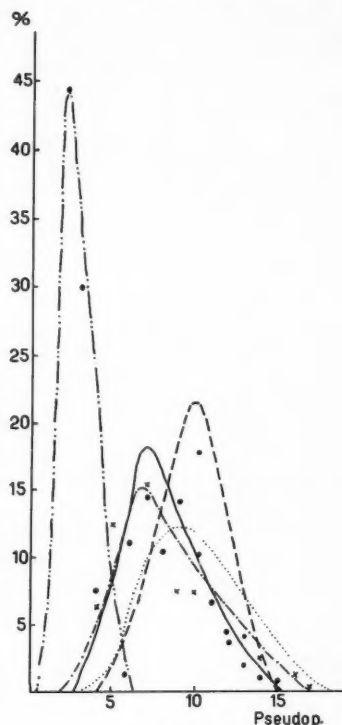


Abb. 12.

Abb. 11. Verteilung der Anzahl der Pseudopodien. Normales Medium, pH-Änderung durch HCl . Normalkurve (pH 7,2) punktiert, ——— pH 6,0, - - - pH 5,0, - · - · - pH 4,0, - - - - - pH 3,5.

Abb. 12. Verteilung der Anzahl der Pseudopodien. Normales Medium, pH-Änderung durch HNO_3 . Normalkurve (pH 7,2) punktiert, ——— pH 5,0, - - - pH 4,0, - · - · - pH 3,5, - - - - - pH 3,0.

abgesetzter „tail“ ist nicht zu beobachten. Nach 6 Stunden sind alle Amöben geschädigt. (Dieser Versuch wurde wegen einer Depression in den Kulturen mit kleinen, in den Kulturschalen gelegentlich schon monopodialen Amöben durchgeführt. Er wurde später mit großen polypodalen und gut genährten Amöben wiederholt.) Dabei zeigten diese völlig das gleiche Verhalten.

f) pH 2,5 (HNO_3)

Die Amöben werden sofort geschädigt. Die Verteilungskurven zeigen nur bei pH 3,0 eine stärkere Verschiebung nach links (gleiche Auswertung wie in den HCl-Versuchen). (Abb. 12.)

3. Änderung des pH durch H_2SO_4

a) pH 6,0 (H_2SO_4)

Normales Verhalten.

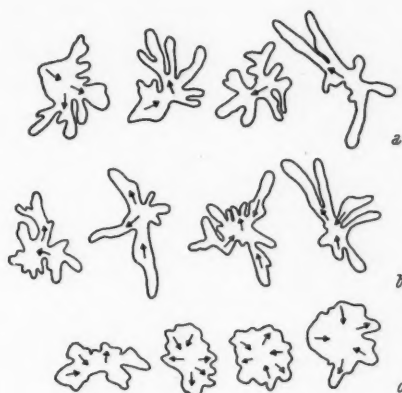


Abb. 13.

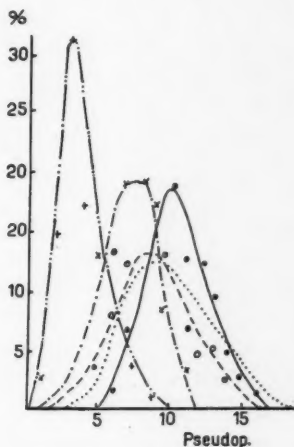


Abb. 14.

Abb. 13. Normales Medium, pH 5,0: a Anfang, b nach 1 1/4 Std., c nach 2 Std.

Abb. 14. Verteilung der Anzahl der Pseudopodien. Normales Medium, pH-Änderung durch H_2SO_4 . Normalkurve (pH 7,2) punktiert, ——— pH 6,0, — — — pH 5,0, — · — · — pH 4,0, — · — · — pH 3,0.

b) pH 5,0 (H_2SO_4)

Die Amöben bewegen sich polypodial; es werden zunächst relativ lange Pseudopodien gebildet, die jedoch nach 2 Stunden kürzer werden. Die Anheftung ist vollkommen gelöst. Die Pseudopodien werden radiär nach allen Richtungen gleichmäßig ausgestreckt (Abb. 13).

c) pH 4,0 (H_2SO_4)

Die Amöben bewegen sich polypodial mit langen Pseudopodien, es werden jedoch weniger Pseudopodien ausgebildet als in den vorangegangenen Versuchen. Die Anheftung ist nur schwach. Es ist keine deutliche Lokomotion zu beobachten. Nur eine von zehn in der Kammer befindlichen Amöben bewegt sich monopodial.

d) pH 3,0 (H_2SO_4)

Die Amöben bewegen sich zwar noch polypodial, die Pseudopodien sind jedoch sehr kurz und breit geworden. Die Amöben erhalten dadurch ein

plumpes Aussehen. Die Anheftung ist aufgehoben, es tritt keine Ortsveränderung ein. Streng monopodiale Formen treten nicht auf.

e) pH 2,5 (H_2SO_4)

Die Tiere werden sofort geschädigt.

Die Verteilungskurven (Abb. 14) zeigen für pH 6,0 eine Verschiebung nach rechts, für pH 5,0—3,0 eine Linksverschiebung und einen zunehmenden Anstieg des Maximum. (Auswertung wie in den HCl-Versuchen.)

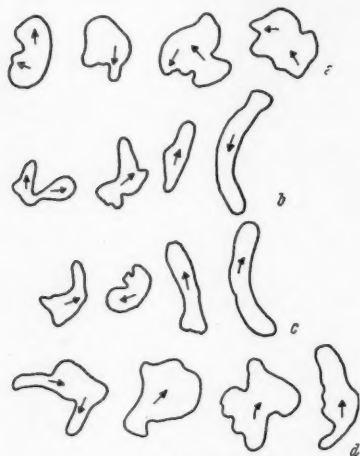


Abb. 15.

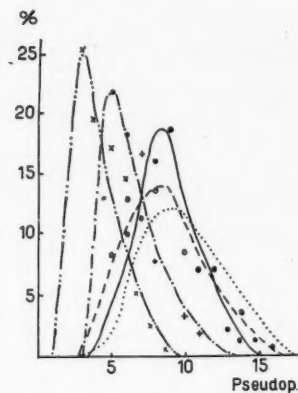


Abb. 16.

Abb. 15. Normales Medium, pH 3,5 ($HCOOH$), a Anfang, b nach 15 Min., c nach 30 Min., d nach 2 Std.

Abb. 16. Verteilung der Anzahl der Pseudopodien. Normales Medium, pH-Änderung durch $HCOOH$. Normalkurve (pH 7,2) punktiert, ——— pH 6,0, - - - pH 5,0, - · - · - pH 3,75, - - - - - pH 3,5.

4. Änderung des pH durch Ameisensäure $HCOOH$

a) pH 6,0 ($HCOOH$)

Normales Verhalten.

b) pH 5,0 ($HCOOH$)

Es werden weniger, aber noch immer relativ lange Pseudopodien gebildet. Die Anheftung an die Unterlage besteht noch, die Ortsveränderung ist jedoch gering. Vorübergehend treten eigenartige Formen auf: Der größte Teil des Cytoplasma bildet eine Kugel. Wo die Kugel die Unterlage berührt, werden kurze Pseudopodien gebildet.

c) pH 4,0 ($HCOOH$)

Die Form ist plumper geworden, die Pseudopodien sind meist kurz, es wird immer nur ein Pseudopodium voll ausgebildet. Nur geringe Anheftung.

d) pH 3,75 (HCOOH)

Die Reaktion ist nicht einheitlich: Es finden sich monopodiale Formen neben polypodialen. Auch nach 22 Stunden zeigt sich noch keine Änderung im Verhalten. Die monopodialen Tiere weisen noch kräftige Vorwölbungen auf. Zählt man bei diesen Formen nur das Vorder- und Hinterende = 2 Pseudopodien, so erhält man eine Kurve, die steiler als die Normalkurve und nach links verschoben ist.

e) pH 3,5 (HCOOH)

Die Amöben sind zuerst plump-polypodial, werden dann aber monopodial. Die monopodiale Form wird aber nicht dauernd beibehalten, sondern sie wird immer wieder von der Bildung eines zusätzlichen Pseudopodium unterbrochen. In den meisten Fällen fließt dann das gesamte Cytoplasma in dieses Pseudopodium hinein und es kommt zu der schon oben erwähnten Richtungsänderung (Abb. 15). Das Verhalten bleibt bis zur 40. Stunde das gleiche, dann erfolgen Abkuglung und Absterben sehr schnell (innerhalb 30 Minuten) aufeinander.

f) pH 3,0 (HCOOH)

Die Amöben werden sofort stark geschädigt und sterben nach kurzer Zeit ab.

Die Auszählung (Abb. 16) der Pseudopodien ergibt wieder eine Linksverschiebung der Verteilungskurven. Ebenso steigen die Maxima von pH 7,2 nach pH 3,5 an. (Gleiche Auswertung wie bei den HCl-Versuchen.)

5. Änderung des pH durch Oxalsäure (COOHCOOH)

a) pH 6,0 (COOHCOOH)

Die Amöben sind polypodial. Deutliche Anheftung und lebhaftes Lokomotion. Nach 48 Stunden kugeln sich die Tiere ab und gehen ein. Vor dem Abkugeln keine monopodialen Formen.

b) pH 5,0 (COOHCOOH)

Die Amöben sind zunächst polypodial; bei einigen ist die Anheftung noch normal, beschränkt sich aber später auf die Spitzen der Pseudopodien. Diese Tiere können sich dann nur noch durch „Stelzen“ fortbewegen. Nach 18 Stunden erfolgt der Übergang zur monopodialen Form. Der Ablauf der Wellenbewegungen vom Vorderende zum Hinterende ist nicht mehr kontinuierlich, sondern ruckartig. (Keine Bruchsackpseudopodien, sondern Perioden größerer Aktivität in der Bildung der wellenförmigen Ausbuchtungen wechseln mit solchen geringerer Aktivität ab.) Gelegentlich kann man beobachten, wie sich die monopodialen Amöben an beiden Enden kontrahieren. Es kommt dann zu einer Stauung in der Mitte, die zu einem neuen Pseudopodium führt. 20 Stunden nach Versuchsbeginn erfolgt Abkuglung, und die Tiere sterben ab, d. h. es läßt sich dann auch unter Zeitraffung keine Bewegung mehr feststellen (Abb. 17).

c) pH 4,0 (COOHCOOH)

Das Verhalten ist das gleiche wie bei pH 5,0. Nach 40 Stunden sind alle Amöben bis auf eine abgekugelt. Bei dieser war auffällig, daß sie nicht mehr fähig war, vor dem Absterben ihre Pseudopodien einzuziehen.

d) pH 3,5 (COOHCOOH)

Die Amöben sind anfangs noch polypodial, nach 30 Minuten allmählicher Übergang zur monopodialen Form. Der Eintritt der monopodialen Form ist bei den einzelnen Tieren zeitlich verschieden. Nach 10 Stunden sind alle Tiere geschädigt und gehen ein (Abb. 18).

e) pH 3,0 (COOHCOOH)

Die Amöben werden sofort geschädigt und sterben nach 30 Minuten ab. Die Auszählung der Pseudopodien ergibt für pH 6,0 eine Ver-



Abb. 17.

Abb. 18.

Abb. 17. Normales Medium, pH 5,0 (Oxalsäure): a Anfang, b nach 15 Min., c nach 20 Std.

Abb. 18. Normales Medium, pH 3,5 (Oxalsäure): a Anfang, b nach 30 Min., c nach 1½ Std.

schiebung der Verteilungskurve nach rechts, für pH 5,0–3,5 wieder eine Verschiebung nach links.

6. Änderung des pH durch Asparagin (Asparaginsäureamid)

a) pH 6,0 (Asparagin)

Anfangs polypodiale Formen; deutliche Anheftung, rasche Ortsveränderung. Pseudopodienform zuerst normal, jedoch später breit und flächig.

b) pH 5,0 (Asparagin)

Polypodial, zuerst ohne Festhaften, radiäre Formen. Später Anheftung verbessert, langgestreckte Form, deutliche Ortsveränderung. Keine flächenhafte Ausbreitung der Pseudopodien. Die Anzahl der gebildeten Pseudopodien nimmt allmählich ab, Übergang zur monopodialen Form mit extrem lang ausgezogenem „tail“. Nach 21 Stunden sind alle Tiere geschädigt. Kurz vor dem Tod läuft noch eine sehr kräftige Welle vom Vorderende zum Hinterende (Abb. 19).

c) pH 4,0 (Asparagin)

Anfangs polypodial, keine Anheftung, radiäre Form; später wird das Festhaften verbessert, Ortsbewegung. Die Gestalt wird gestreckter. An den Spitzen der Pseudopodien werden hyaline Kappen ausgebildet. Nach 12 Stunden kugeln sich die Tiere ab und gehen ein, ohne vorher die monopodiale Form angenommen zu haben.

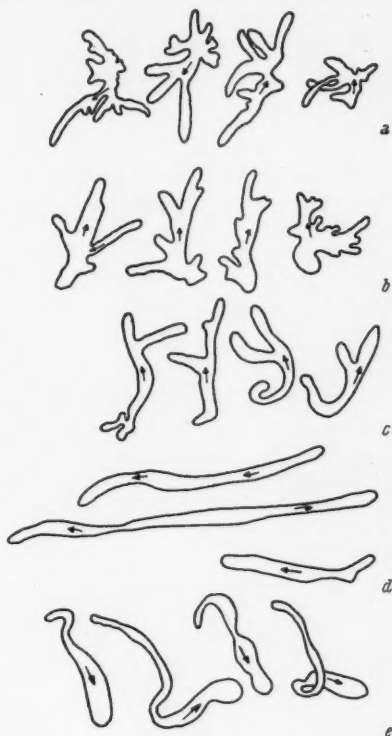


Abb. 19.

Die Verteilungskurven (Abb. 20) zeigen für pH 6,0—4,0 wieder eine Verschiebung nach links. Die Maxima erfahren ebenfalls wieder einen Anstieg.

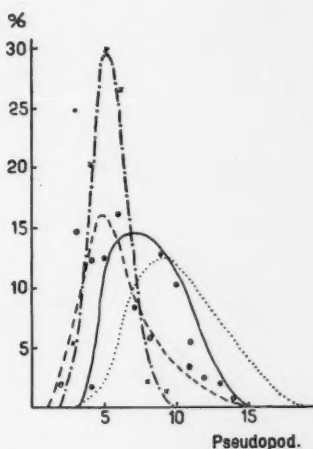


Abb. 20.

Abb. 19. Normales Medium, pH 5,0 (Asparagin): a Anfang, b nach 45 Min., c nach 5 Std., d nach 8 Std., e nach 16 Std.

Abb. 20. Verteilung der Anzahl der Pseudopodien. Normales Medium, pH-Änderung durch Asparagin: Normalkurve (pH 7,2) punktiert, — pH 6,0, - - - 5,0, - · - · - pH 4,0.

7. Änderung des pH durch Essigsäure CH_3COOH

a) pH 6,0 (CH_3COOH)

Es werden lange Pseudopodien gebildet; die Amöben bewegen sich polypodial; sie haften gut an der Unterlage. Dauernd deutliche Ortsveränderung; die Form ist langgestreckt.

Bei einem pH unter 6,0 werden die Amöben sofort geschädigt.

C. Analysen einiger Bewegungsvorgänge im Zeitrafferlaufbild

1. An Amöben in normalen Medien, pH 7,2–6,0

Bei der Beobachtung des Laufbildes hat man sofort den Eindruck, daß die Bewegung rhythmisch erfolgt. Es ist sehr schwierig festzustellen, worin dieser Rhythmus besteht. Bei der Betrachtung der Phasenbilder sieht man folgendes (Abb. 21):

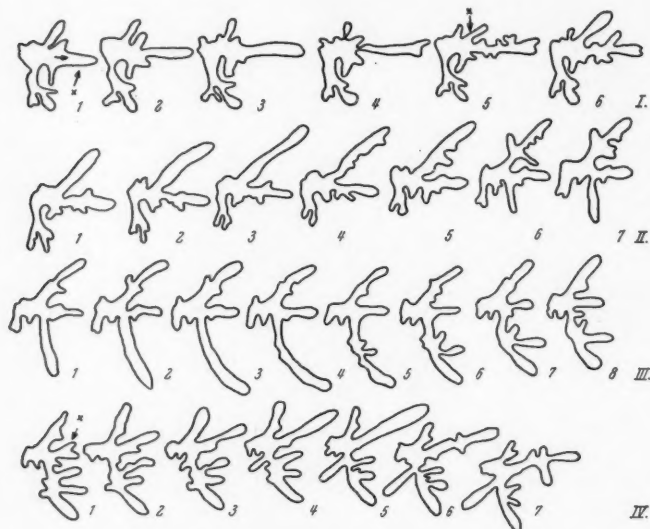


Abb. 21. I: 1. 2. 3. 4. 5. 6., II: 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7., III: 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8., IV: 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. (Man beachte besonders die durch [x] bezeichneten Pseudopodien.)

1. Es ist immer nur ein Pseudopodium, das die Hauptbewegung (vorwärtsströmendes Cytoplasma, Ausbildung eines breiten Pseudopodium ausführt. (I/1, I/5, II/5, IV/1, jeweils der Beginn der Ausbildung des Hauptpseudopodium.)

2. Das Pseudopodium wird zuerst ohne Seitenpseudopodien ausgebildet. (I/1–3, I/5–II/3, III/1–4, IV/1–5.)

3. Erst wenn das Hauptpseudopodium seine volle Länge erreicht hat, strömen auch seitliche Verzweigungen hervor (I/4, II/4, III/4, IV/5).

4. Vor der Ausbildung des Hauptpseudopodium ist es schon vorgebildet und als kleines Pseudopodium vorhanden.

5. Im Augenblick der größten Ausdehnung des Hauptpseudopodium beginnt das Wachstum des „nächsten“ Hauptpseudopodium (I/5, II/5, IV/1).

6. An den Hauptpseudopodien entstehen immer Nebenpseudopodien.
7. Es wird immer gleichzeitig mit der Bildung eines Hauptpseudopodium an einer anderen Stelle ein Pseudopodium eingezogen.

2. An Amöben in normalen Medien, pH 6,0

Bei den Formen, die noch nicht dauernd monopodial sind, sieht man häufig folgendes: An einer Stelle der Amöbe zeigt sich seitlich eine Delle, die allmählich von vorn nach hinten verschoben wird und an Ausdehnung (Tiefe) zunimmt. An der rückwärtigen Seite dieser Delle bildet sich eine Cytoplasma-Stauung, die der Ausgangspunkt eines neuen Pseudopodium ist (Abb. 22).

Wenn die Amöben stark erschüttelt oder in ein anderes Medium gebracht werden, ziehen sie die Pseudopodien ein und kugeln sich ab. Sofern

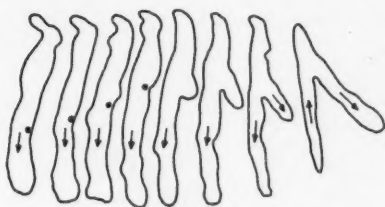


Abb. 22.

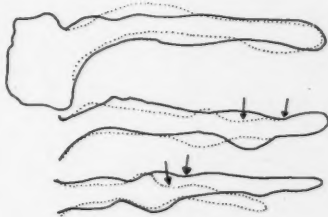


Abb. 23.

Abb. 22. Amöbe in normalem Medium (pH 4,0 [H_2SO_4]). Phasen in 30 sec Abstand. Eindellung durch einen Punkt markiert (von links nach rechts).

Abb. 23. Normales Medium (pH 7,2). Erstes Pseudopodium nach Abkuglung. Phasenabstand 30 sec. Von oben nach unten. Die nachfolgenden Stadien punktiert.

das neue Medium keinen schädigenden Einfluß hat, erfolgt nach etwa 20 sec die Neubildung von Pseudopodien. Diese geschieht meist so, daß zuerst ein langes Pseudopodium gebildet wird (Abb. 23). Wenn dieses voll ausgebildet ist, werden Seitenpseudopodien ausgestreckt und auch an anderen Stellen des abgekugelten Teiles der Amöbe erscheinen Pseudopodien. An dem zuerst gebildeten Pseudopodium kann man folgendes beobachten: Vom äußeren Ende des Pseudopodium her wird an einem Teil des Pseudopodium der Durchmesser verkleinert (kontrahiert). Proximal von dieser Kontraktion staut sich das Cytoplasma und bildet eine knotenartige Verdickung. Der „Knoten“ und die Verengung werden allmählich proximal verschoben. Aus dem Knoten entsteht dann ein Seitenpseudopodium.

Bei den streng monopodialen Amöben ist die Wellenbewegung, wie schon erwähnt, am deutlichsten ausgeprägt. Man beobachtet wieder die Eindellung, die sich vom physiologischen Vorderende zum Hinterende bewegt. Vor der Eindellung kommt es wieder zu einer Stauung. Die Welle läuft bis zum „tail“. Ein Durchgang dauert etwa $32 \times 15 \text{ sec} = 8 \text{ Minu-}$

ten. Die nächste Welle folgt im Abstand von etwa $15 \times 15 \text{ sec} = 3\frac{1}{4} \text{ Min.}$ In Abb. 24 ist nur die linke Begrenzung der Amoebe gezeichnet. Auf der rechten Seite erfolgt die Bewegung in der gleichen Weise. (Der Abstand von $3\frac{1}{4}$ Minuten bezieht sich auf die Folge links-rechts-links.) Wenn die erste Welle etwa $\frac{4}{5}$ des Weges zurückgelegt hat, beginnt die nächste Welle (auf der gleichen Seite) ihren Weg (Abb. 24).

Man findet diese Wellenbewegung auch bei monopodialen Amöben, die ihre Haftfähigkeit vollkommen verloren haben: Das Cytoplasma strömt sehr heftig von vorn nach hinten, ohne daß eine Ortsveränderung stattfindet.

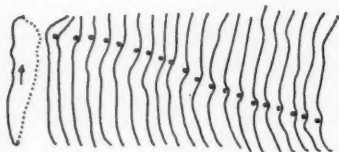
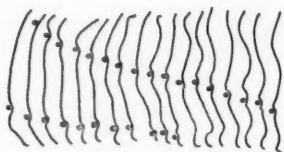


Abb. 24.



Der Anfang dieser Wellenbewegung kann sich gelegentlich als Ausschlag des ganzen Vorderendes nach links und rechts manifestieren (Abb. 25).

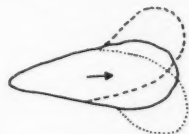


Abb. 25.

Abb. 24. Verlauf der Wellenbewegung bei einer monopodialen Amöbe. Nur die linke Begrenzung ist gezeichnet. Phasenabstand: 15 sec.

Abb. 25. Ausschlag des Vorderendes bei einer monopodialen Amöbe.

D. Besprechung der Ergebnisse

Bei der Untersuchung des Einflusses von Säuren waren verschiedene Autoren zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Chalkley und Daniel (1934): Hemmung der Cytoplasmateilung durch Milchsäure. Hopkins (1926): pH 6,7 und 7,6 Optima für normales Aussehen und gute Beweglichkeit. Taylor (1924) fand, daß Amöben in einem pH-Bereich von 3,0–8,0 leben können. Optimum bei pH 6,6. Dies ist in deutlicher Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen. Die Rechtsverschiebung der Verteilungskurven bei pH 6,0 zeigt, daß auch für *Chaos chaos* das Optimum unter pH 7,2 liegt. Edwards (1924) beschrieb die Wirkung verschiedener Säuren auf *Amoeba proteus*: Die Oberfläche wird „sticky“, die Bewegung wird eingeschränkt und die Strömung wirkt heftig und unkoordiniert; der „tail“ kontrahiert sich. Edwards vermutete, daß dies bewegungsphysiologische Verhalten den H-Ionen zuzuschreiben ist. Er hat die Amöben jedoch nur in reinen Säuren untersucht. Loeb (1928) erwähnt lang ausgezogene Formen von Amöbocyten in sauren Zuckerlösungen. Corson (1937) fand, daß Zugabe von anorganischen Säuren zu einer K- oder Na-Salzlösung eine Abnahme der Viskosität verhindert, die in neutralen oder schwach alkalischen Lösungen eintritt.

Mast (1928) zitiert eine Fülle von Tatsachen, die darauf hindeuten, daß die Form der Amöben sehr veränderlich ist. In reinen Säuren, die auf pH 5,0 bis 6,9 verdünnt wurden, zogen die Amöben ihre Pseudopodien ein. Erst nach 4 bis 5 Stunden kam die Bewegung wieder in Gang. Die Amöben bewegten sich dann nur noch monopodial. In M/500 Saccharose und Laktose trat der gleiche Vorgang ein. Mast schloß daraus, daß der Wechsel der Form nicht von äußeren Faktoren abhängig ist (Oberflächenkräfte), sondern von inneren Faktoren geregelt wird. Mit Hinweis auf Versuche von Chalkley begründet er die Formveränderungen mit dem wechselnden Wassergehalt in der Amöbe. Hopkins hatte auch angenommen, daß durch die pH-Änderung die Salzdurchlässigkeit und damit der Wassergehalt der Amöbe beeinflusst wird. Løvtrup und Pigon (1951) haben mit D₂O und H₂O¹⁸ den Wasserhaushalt bei *Chaos chaos* untersucht und fanden, daß der Wassertransport durch die Membran nur 2–4% des Gesamtvolumens pro Stunde beträgt. Das ist nur ein sehr geringer Betrag, durch den auch die geringe Formveränderung in Aqua bidest. und auch in Lösungen mit erhöhtem osmotischem Wert erklärt wird. Ob sich der Formwechsel der Amöben bei pH-Änderung durch Änderung des Wassergehaltes verstehen läßt, müßte durch genaue Volumenmessungen und Messungen des Wassergehaltes nach der Methode von Løvtrup und Pigon mit schwerem Wasser geklärt werden. Dagegen spricht die Tatsache, daß mit abnehmendem pH das Cytoplasma der Amöben nicht heller wird (durch den größeren Abstand der Inhaltsbestandteile nach Wasseraufnahme), sondern dunkler und dichter granuliert erscheint.

Pantin (1924) kam durch Temperaturversuche zu dem Schlusse, daß der amöboiden Bewegung ein enzymatischer Vorgang zugrunde liegen muß. Goldacre (1952) fand, daß bei Amöben eine Reaktion auf einen Berührungssreiz nur dann eintritt, wenn die Membran so weit eingedrückt wird, daß sie mit dem granulierten Cytoplasma in Kontakt kommt. Er nahm an, daß die Membran als ein „non difussible“ Substrat im granularen Cytoplasma wirkt. Durch Zugabe von Anaesthetika konnte er erreichen, daß sich die Membran abhob. Er konnte ferner zeigen, daß dies nicht durch Wasseraufnahme geschah, sondern daß sich das granuliert Cytoplasma zurückzog. Siehe auch Abb. 1: Hyaliner Raum nach Erhöhung der Temperatur, das granuliert Cytoplasma hat sich kontrahiert und ist zunehmend dichter und dunkler geworden. Ebenso Abschnitt d, S. 90, pH 3,5 (HCl): Kontraktion des granulierten Cytoplasma und dadurch entstehender hyaliner Saum.

Es scheint demnach wahrscheinlicher, daß durch Änderung des pH primär enzymatische Vorgänge beeinflusst werden und sich dadurch sekundär die Wasserdurchlässigkeit der Membran und der Wassergehalt ändern kann. Selbst wenn sich der Wassergehalt der Amöbe ändert (die Pringsheim-Lösung ist in bezug auf das Cytoplasma der Amöben hypotonisch), muß daraus noch nicht unbedingt eine Formänderung bzw. das Unvermögen Pseudopodien zu bilden, resultieren. Es ist eher anzunehmen, daß durch Wasseraufnahme das Cytoplasma flüssiger wird und dadurch die Pseudopodienbildung erleichtert ist.

Wie entsteht ein Pseudopodium? Um diese Frage zu beantworten, muß man zuerst die amoeboide Bewegung selbst zu erklären versuchen. Für die amoeboide Bewegung gibt es sehr viele Erklärungen. Sie sollen hier nur stichwortartig angeführt werden. Eine ausführliche Zusammenstellung gibt De Bruyn (1947).

Ehrenberg 1830: Pseudopodien sind bruchartige Vorwölbungen an einer lokal geschwächten Stelle des Amoebenkörpers. Bewegung durch Kontraktion des Restkörpers.

Dujardin 1835: Amoebe: Sarkode, die die Eigenschaft der Dehnbarkeit und Kontraktion besitzt.

Ecker 1849: Bestreitet aktive Dehnung. Pseudopodien nur durch Kontraktion des Restkörpers.

Wallich 1865: Bewegung durch Kontraktion der äußeren Schicht (Ectosarc). Ecto- und Endosarc sind keine permanenten Strukturen, sie können ineinander übergehen.

De Bary 1864: Aktive Expansion an den Spitzen der Pseudopodien; Saugwirkung.

Greeff 1874: Zentrales Cytoplasma ist weniger viskös als die äußeren Schichten.

Schulze 1875: Das am Hinterende aufgenommene Material wird am Vorderende abgelagert.

Gruber 1882: Kontraktion ist mit Dehydratation des Cytoplasma verbunden.

Heitzmann 1873: Protoplasma ist nicht homogen. In eine nicht kontraktile Flüssigkeit ist ein dreidimensionales Netzwerk eingebettet.

Schäfer 1883: Nicht das Netzwerk, sondern das Hyaloplasma ist kontraktile.

Engelmann 1879: Das Protoplasma ist aus kontraktile Partikeln von molekularer Dimension zusammengesetzt. Bewegung durch Formveränderung dieser Partikel. Formänderung durch Wasseraufnahme.

Sachs 1882: Strömung am Ende eines Pseudopodium durch Störung eines labilen Gleichgewichts der Moleküle.

Als mit der Verbesserung der mikroskopischen Technik kein Netzwerk im Protoplasma gesehen werden konnte, ließen sich die Kontraktionstheorien nicht halten und man suchte nach anderen Erklärungen:

Flemming 1882: Kein Netzwerk, sondern isolierte Partikel in einer homogenen Flüssigkeit. Partikel fadenförmig.

Altmann 1890: Partikel nicht fadenförmig, sondern in Gestalt von Granulen.

Bütschli 1892: Keine Granulen, sondern Tropfen.

Berthold 1886: Protoplasma verhält sich wie eine Flüssigkeit. Bewegung durch Oberflächenkräfte. Ebenso Quincke (1888) und Bernstein (1900).

Bütschli 1892: s. o. Bewegung durch Oberflächenkräfte. Schaumstruktur des Protoplasma.

Rhumbler 1898: Anheftung an die Unterlage. Pseudopodienbildung

durch lokale Herabsetzung der Oberflächenspannung; Viskositätsunterschied zwischen Ecto- und Endoplasma (Ectoplasma-Endoplasma-Prozeß). Erweiterung 1905: Kontraktion am Hinterende durch Dehydratation „Gelatinerungsdruck“.

Dellinger 1906: Verwarf Oberflächentheorie, weil Amöben nicht Tropfenform haben. Beobachtete „Stelzbewegung“.

Mast und Root 1916: Amöben können aufgenommene Paramaecien quer durchschnüren. Errechneten, daß Oberflächenkräfte dazu nicht ausreichen.

Es folgt dann eine Periode, in der man die amöboide Bewegung mehr unter kolloidchemischen Gesichtspunkten betrachtete.

Hyman 1917: Pseudopodienbildung durch lokale Verflüssigung des Ectoplasma-Gels. Die Spannung des Ectoplasma preßt das Pseudopodium nach außen. „Gelation is the cause of contractility.“

Giersberg 1921: Widerlegt die Wabentheorie Bütschlis. Das Cytoplasma ist aus zahlreichen kolloidalen Substanzen zusammengesetzt.

Pantin 1923: Das Ectoplasma bildet einen Schlauch, am Hinterende Abbau durch Wasserabgabe, am Vorderende durch Wasseraufnahme und Vergelung des Endoplasma Anlagerung und Verlängerung. Kontraktion ist identisch mit „Syneresis“.

Mast 1931: Wie Pantin, jedoch Plasma-Gel-Kontraktion nur durch Elastizität des Plasma-Gels bedingt.

Heilbrunn und Daugherty 1939 schrieben dem Protoplasma thixotrope Eigenschaften zu. Durch den mechanischen Druck der Granulen gegen das Plasmagel entsteht eine Verflüssigung, durch die ein Pseudopodium entsteht.

Fenn 1945 erklärt den Wechsel von Gel-Sol als das Ergebnis der Strömung, die mechanisch das Gel abbaut. Wo die Strömung aufhört, werden die Bausteine wieder angelagert. Bewegung durch Kontraktion des Plasmagel.

Goldacre und Lorch 1950 erklärten den Übergang Gel-Sol durch das Zusammenfallen von Proteinmolekülen.

Man nimmt heute allgemein an, daß die Kontraktion des Plasmagel für die Bewegung verantwortlich ist. Goldacre und Lorch haben auch gezeigt, daß durch intracelluläre Injektion von ATP eine Kontraktion und Verflüssigung des Plasmagel erreicht werden kann.

Goldacre 1952 nimmt an, daß zwischen der Membran und dem granulierten Cytoplasma enzymatische Vorgänge ablaufen und dabei ATP-artige Substanzen beteiligt sind. (Über den Einfluß des ATP im 2. Teil Näheres.)

Für die amöboide Bewegung gilt demnach auch heute noch die Mast-Pantinsche Anschauung des Ectoplasma- (Plasmagel-) Schlauches. Durch lokalisierte Verflüssigungen kommt es zur Ausbildung von seitlichen Pseudopodien. Die durch Stauung herbeigeführte Pseudopodienbildung läßt sich mit der These von Goldacre gut vereinbaren: Durch die Stauung kommt das granulierten Cytoplasma mit der Membran in Berührung. Das Plasmagel wird an dieser Stelle verflüssigt und es wird ein Pseudopodium gebildet. Auch bei den Amöben

in normalem Medium ließ sich die Bildung der Seitenpseudopodien an einem schon vorhandenen Pseudopodium erklären. Die Kontraktionswelle wird um so ausgeprägter sein, je weniger Pseudopodien vorhanden sind bzw. je größer das Volumen des Pseudopodium ist. Im normalen Medium ist nur eine schwache, nur kurz andauernde und deshalb nicht sichtbare Stauung nötig, um diesen Kontakt zu ermöglichen. Mit zunehmender Senkung des pH wird das Plasmagel visköser, und es kommt nur noch bei starken Stauungen granuliertes Cytoplasma mit der Membran in Kontakt.

Über die Ursache und Entstehung dieser Kontraktionswelle ist damit noch nichts ausgesagt. Es scheint dabei aber nur die äußerste Schicht (Plasmalemma) beteiligt zu sein, und es sind offenbar die gleichen Kräfte, die dem „tail“ und den Spitzen der einziehenden Pseudopodien das zerknitterte Aussehen geben. Lewis (1931, 1939, 1942) hat mit Hilfe von Zeitraffer-Filmaufnahmen an Leukozyten ähnliche Erscheinungen beobachtet. Bei den Leukozyten bildet sich an der Basis der Pseudopodien ein Kontraktionsring aus, der einen kleineren Durchmesser als das entstehende Pseudopodium hat. Dieser Kontraktionsring bleibt aber auf der Stelle stehen, während der Leukozyt gleichsam hindurchkriecht. Bei den monopodialen Amöben in saurem Medium ist das Umgekehrte der Fall: Die Amöbe bewegt sich auf der Stelle, und die Kontraktionswelle wandert vom Vorder- zum Hinterende (s. Abb. 24). (Die Amöbenhälften sind in der tatsächlichen Lage gezeichnet. Keine Ortsveränderung.)

Ganz allgemein läßt sich noch sagen, daß durch die Formänderung in Medien mit verschiedenem pH eine systematische Einteilung der Amöben (Schaeffer 1927) nach Form und Anzahl der Pseudopodien nicht möglich ist, es sei denn, daß das pH des Fundorts bekannt ist. Ebenso ist das Ergebnis, daß sich Gestalt und Form der Amöben ändern, wenn die Art der Nahrung geändert wird (Mast 1938), nur dann richtig, wenn bei gleichbleibendem pH beobachtet wird.

E. Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Verhalten der Amöbe *Chaos chaos* L. wurde in Medien mit verschiedenen pH-Werten untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse sind:

1. Mit abnehmendem pH nimmt auch die Anzahl der gleichzeitig vorhandenen Pseudopodien ab (Linksverschiebung der Verteilungskurven).
2. Die zahlenmäßig zu erfassenden Möglichkeiten der Pseudopodienbildung werden mit sinkendem pH eingeschränkt (Steilerwerden der Kurven).
3. Diese Wirkung ließ sich mit verschiedenen, H-Ionen abdissoziierenden, Reagenzien herbeiführen.
4. Die Pseudopodienbildung geschieht nicht örtlich und zeitlich wahllos, sondern unterliegt gewissen Gesetzmäßigkeiten.
5. Die Pseudopodienbildung hat als „Vorstufe“ eine aus einer Kontraktionswelle resultierende Stauung des Cytoplasma.
6. Die monopodialen Amöben behalten als letzten Rest des Pseudopodienbildungsvermögens die sich vom Vorderende zum Hinterende bewegend Kontraktionswellen.

7. Die Wellenbewegung beginnt am Vorderende als Ausschlag seitlich zur Längs- bzw. Bewegungsrichtung.

Literatur

- Andresen, N., 1942: Cytoplasmic Components in the *Amoeba Chaos chaos* L. C. r. trav. lab. Carlsberg 24.
- Chalkley und Daniel, 1954: The effect of certain chemicals upon the division of the cytoplasm in *A. proteus*. Protoplasma 21.
- Corson, A. S., 1937: The mechanism of salt penetration in *Amoeba*. Biol. Bull. 75.
- De Bruyn, P. P. H., 1947: Theories of Amoeboid Movement. Quart. Rev. Biol. 22 (hier auch weitere Literaturangaben für die Zeit vor 1900).
- Dellinger, O. P., 1906: Locomotion of *Amoebae* and allied forms. J. Exper. Zool. 3.
- Edwards, J. G.: The effect of chemicals on locomotion in *Amoebae*. J. Exper. Zool. 58, 1923, und Brit. J. Exper. Biol. 1, 1924.
- Fenn, W. O., 1945: Contractility. Physical Chemistry of Cells and Tissues. Blakiston, Philadelphia.
- Giersberg, H., 1921: Untersuchungen zum Plasmabau der Amöben, im Hinblick auf die Wabentheorie. Arch. Entw.-Mech. 51.
- Goldacre and Lorch, 1950: Folding and unfolding of proteine molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work. Nature 16.
- Goldacre, R. J., 1952: The action of general anaesthetics on *Amoeba* and the mechanism of the response to touch. Symp. Soc. Exper. Biol. 6.
- Heilbrunn und Daugherty, 1926: The electric charge of protoplasmic colloids. Physiol. Zool. 12.
- Hopkins, D. L., 1926: The effect of H-Concentration on locomotion and other life-processes in *Amoeba proteus*. Proc. Nat. Acad. Sci. 12.
- Kuhl, W., 1942: Kinematische Zellforschung. Biol. gen. 16.
- Lewis, W. H., 1931: Locomotion of lymphocytes. Bull. John Hopk. Hosp. 49.
- 1939: The role of superficial plasmagel layer in changes of form, locomotion and division of cells in tissue cultures. Arch. exper. Zellforsch. 23.
- 1942: The relation of the viscosity changes of protoplasma to amoeboid locomotion and cell division. Structure of Protoplasm. Iowa State College Press, Ames.
- Loebl, L., 1928: Amoebocyte tissue and amoeboid movement. Protoplasma 4.
- Løvtrup und Pigon, 1951: Diffusion and active transport of water in the *Amoeba Chaos chaos* L. C. r. trav. lab. Carlsberg 28.
- Mast, S. O., 1928: Factors involved in change in form in *Amoeba*. J. Exper. Zool. 51.
- Locomotion in *A. proteus*. Protoplasma 14, 1931, und Biol. Bull. 77, 1938.
- Mast and Root, 1916: Observations on amoeba feeding on rotifers, nematodes and ciliates, and their bearing on the surface tension theory. J. Exper. Zool. 21.
- Pantin, C. F. A.: On the physiology of amoeboid movement. I: J. Mar. Biol. Ass. 15, 1923, und II: Brit. J. Exper. Biol. 1, 1924, und dto. Protoplasma 2, 1927.
- Schaeffer, A. A., 1926: Taxonomy of the amoebas. Dept. Mat. Biol. Carnegie Inst. of Washington 24.
- Spek und Gillissen, 1945: Die Zellmembran der Amöben — eine chromotrope Substanz. Protoplasma 57.

Virus-Eiweißkristalle in *Phajus grandifolius*

Von

Irmtraud Thaler

Aus dem Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen der Universität Graz

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Mai 1960)

Über das Vorkommen von Eiweißkristallen bei Orchideen liegen bisher nur wenige Angaben vor. Zimmermann (1893, 136) gibt sie für *Trichopilia tortilis* und *Vanda furpa an*, ferner auch an wenig beachteter Stelle (1893, 152, 153) für *Acropera Loddigesii*, *Listera ovata*, *Paphiopedilum barmatum*, *P. insigne*, *P. venustum*, Mikosch (1890) für *Oncidium microchilum*. Man hat damals diese Kristalle als normale Zellinhaltskörper angesehen, und zwar als Reservestoffe oder Exkrete, ebenso wie die morphologisch ganz ähnlichen Gebilde, die Molisch 1883 in der Kaktee *Epiphyllum* gefunden hat. Nachdem aber durch Rosenzopf (1931) nachgewiesen worden ist, daß die *Epiphyllum*-Spindeln keine normalen, sondern pathologische Zelleinschlüsse sind, die nur bei Virusinfektion entstehen, hat Weber 1954 die Frage aufgestellt, „ob alle Pflanzen mit Cytoplasma-Eiweißspindeln Virus-träger sind?“ Thaler 1954 glaubt dies für *Valerianella* verneinen zu können. Für die kubischen Eiweißwürfel der Kartoffel ergab sich durch die Untersuchungen von Eicke und Köhler (1943), Fedotina (1957), Hölzl und Bancher (1958), daß sie nicht aus Viruseiweiß bestehen, sondern aus Reserveeiweiß, „das keiner gesunden Kartoffel fehlt“. Unwahrscheinlich ist es auch, daß die „Rhabdoiden“ von *Drosera* Virusproteine sind (Brat, Kenda und Weber 1951, Weber 1954). Dagegen haben Miličič und Udjbinač (1960) für die von Nestler (1906) entdeckten Eiweißkristalle von *Capsicum annum* nachgewiesen, daß es Viruskörper sind. Wie es in dieser Hinsicht mit den Proteinkristallen der Orchideen steht, soll im folgenden erörtert werden.

Die oberirdischen Stammknollen von *Phajus grandifolius* sind ein bekanntes Objekt zur Demonstration von Eiweißkristallen, die in oder an Plastiden entstehen (Lit. bei Meyer 1920, 92). An einem Exemplar dieser Spezies, das in einem Gewächshaus des Botanischen Gartens der Universität

Graz kultiviert wird und in diesem Winter zum ersten Mal zur Blüte kam (Abb. 1), wurden in den Epidermiszellen der Blüten- und Laubblätter neben den bereits bekannten Eiweißkristallen der Leukoplasten auch im Cytoplasma spindel-, nadel-



Abb. 1. Blütenstand von *Phajus grandifolius*.

förmige, zopfartige oder prismenartige von einer Spindel durchzogene Kristalle gefunden (Abb. 2, 3, 4, 5). Diese Gebilde sind positiv doppelbrechend und geben die Millon- und Xanthroproteinreaktion. Sie sind sehr unbeständig in ihrem Auftreten und liegen innerhalb des Plasmakörpers, wie man sich leicht durch Plasmolyse überzeugen kann. Im Mesophyll und im Palisadengewebe treten hauptsächlich homogene und

viel schwächer lichtbrechende Spindeln auf. Junge Blätter besitzen keine ausgebildeten Spindeln. Sie zeigen im Protoplasma oft in der Nähe des Kernes granuliert Massen (Abb. 6), die unscharf abgegrenzt sind und deren Gra-

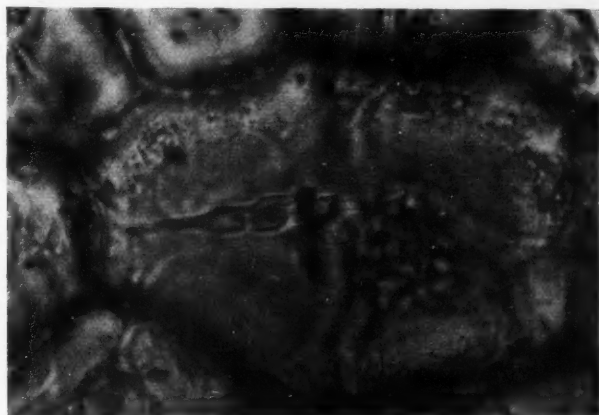


Abb. 2. Epidermiszelle der Laubblattunterseite: Prismenartige Eiweißkristalle, die durch Eiweißfibrillen verbunden sind.

nula wohl hauptsächlich aus Eiweiß bestehen. Ölkügelchen, die sonst sehr häufig in x-bodies vorkommen, konnten hier weder mit Sudan noch mit dem Fluorochrom Coriphosphin nachgewiesen werden. Auch Vakuolen treten

nicht auf. Aus einem solchen x-body sieht man kleine Kristallnadeln entstehen, die sich parallel zueinander ordnen und zu kleinen Spindeln zu-

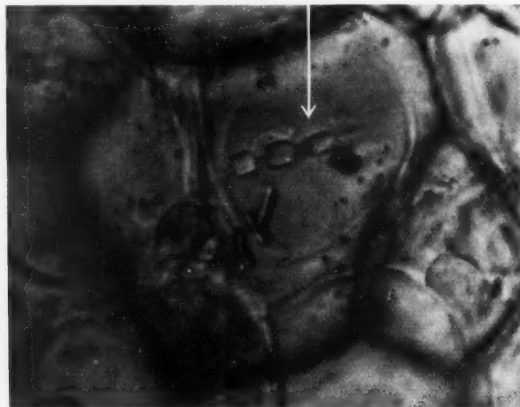


Abb. 3. Epidermiszelle der Tragblattunterseite, ähnlicher Kristall wie Abb. 2.

sammensetzen. Aber auch schon ganz kleine Spindeln lassen ungefähr in der Mitte einen prismatischen Körper in Form kleiner Stäbchen erkennen.

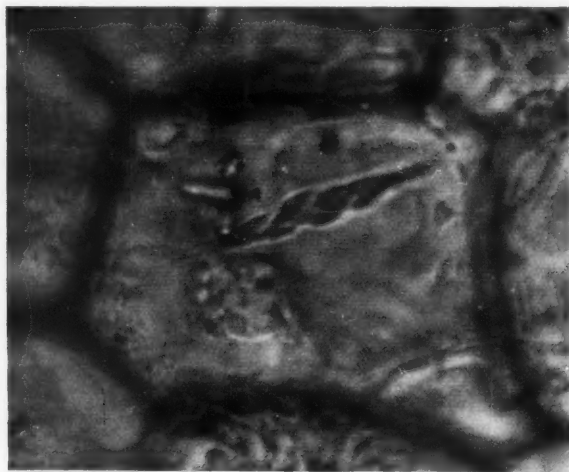


Abb. 4. Epidermiszelle der Tragblattunterseite, Zopfartige Eiweißspindel.

Eine Ähnlichkeit mit diesen Gebilden zeigen die von Wehrmeyer (1959) untersuchten schleifenartigen Viruseinschlußkörper des Tabaks. Diese können oft ganz durch Prismen ersetzt werden. Bei der fortschreitenden Kristall-

bildung wird bei *Phajus* der x-body ganz verbraucht und ist wohl daher in ausgebildeten Blättern nicht mehr vorhanden. Die jungen Spindeln bestehen aus kurzen Kristallpaketen, die später miteinander verschmelzen. Im alten Blatt kann man ein Auffasern der Spindeln beobachten. Da bei *Phajus grandifolius* neben den Eiweißspindeln auch x-bodies vorkommen, kann wohl angenommen werden, daß die Einschlüsse Symptome einer Virose sind. Für Viruseinschlußkörper hielten auch Weber und Weber (1959) die von ihnen in mosaikfleckigen Blättern von *Listera cordata* gefundenen spindeligen oder anders geformten Einschlüsse.

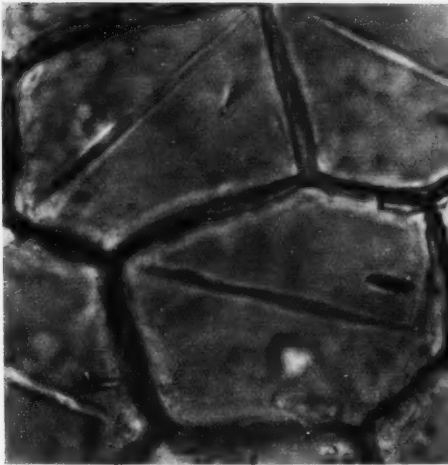


Abb. 5.

Abb. 5. Epidermiszellen der Laubblattunterseite; Eiweißspindeln, die ungleichmäßig dick sind.



Abb. 6.

Abb. 6. Epidermiszelle der Tragblattunterseite: Drei Kristallpakete (dunkel), die aus einzelnen Nadeln bestehen, in einem x-body.

Virosen sind schon von ungefähr 18 Gattungen der Orchideen bekannt (vgl. Köhler und Klinkowski 1954, Smith 1957, Withner 1959) u. a. von *Vanda*, *Oncidium* und *Cattleya*. Die äußeren Krankheitssymptome variieren sehr stark. So können helle Flecken, helle oder dunkle Ringe auf den Blättern auftreten, auch eine Scheckung der Blüten ist nicht selten. Über eine Virose bei *Phajus grandifolius* liegen in der mir zugänglichen Literatur keine Angaben vor. Unsere Pflanze zeigt als einziges makroskopisch sichtbares Krankheitssymptom kleine gelbe Flecken am Laubblatt. Neben der *Phajus*-Pflanze wird eine *Cattleya labiata* kultiviert, die keine äußeren Krankheitssymptome zeigt. Bei der näheren Untersuchung konnten

in den Epidermiszellen der Ober- und Unterseite des Laubblattes mit Ausnahme der Schließzellen Eiweißspindeln beobachtet werden. Entweder ist in jeder Zelle eine große Spindel ausgebildet (Abb. 7) oder man findet bis zu 7 kleine Spindeln in einer Zelle. Auch im Mesophyll kommen vereinzelt diese Einschlusskörper vor. Sie geben die Eiweißreaktionen, färben sich mit Säurefuchsin rot und bleiben in Alkohol z. T. erhalten. X-bodies konnten in den vollkommen ausgebildeten Blättern nicht beobachtet werden, junge Blätter standen nicht zur Verfügung. Die oberirdischen Stammknollen bilden solche Einschlusskörper nur vereinzelt in der Epidermis. Diese Einschlusskörper sind im Gegensatz zu denen von *Phajus* immer homogen, schwächer lichtbrechend und formenarm.

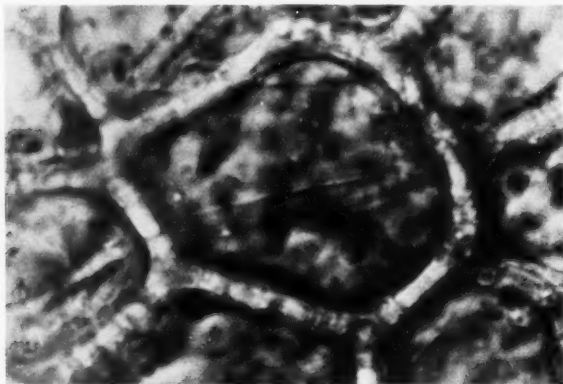


Abb. 7. *Cattleya labiata*. Große Eiweißspindel in einer Blattepidermiszelle.

Nachdem somit die Eiweißkristalle von *Phajus grandifolius*, die im Cytoplasma gefunden wurden, als Virus-Einschlusskörper erkannt sind, drängt sich die Frage auf, ob die schon seit den Arbeiten von Schimper (1883) und Meyer (1882) bekannten Eiweißkristalle der Trophoplasten von *Phajus* Produkte normaler synthetischer Aktivität der Plastiden sind oder aber ebenfalls Gebilde, die nur in den Plastiden virusinfizierter Pflanzen entstehen. Dies zu entscheiden, wird nicht leicht sein. Man müßte wissen, ob es auch *Phajus*-Pflanzen gibt, deren Chloroplasten und Leukoplasten keine Kristalle bilden; dann könnte man versuchen, durch Virusinfektion solche Pflanzen zur Kristallbildung in den Plastiden zu veranlassen. Oder man könnte versuchen, andere Orchideen, die normalerweise keine Trophoplasten kristalle besitzen, mit *Phajus*-Preßsaft zu infizieren und nachsehen, ob sie dann in den Plastiden Kristalle bilden.

Von Interesse wäre es ferner, ob die altbekannten Plastidenkristalle und die hier beschriebenen sich mikrochemisch und vitalfärberisch gleich oder verschieden verhalten. Von den Viruskristallen des Cytoplasmas sollte man annehmen, daß sie Ribonucleinsäure enthalten, bei den Plastiden-

kristallen wäre dies wohl auch möglich, aber doch weniger wahrscheinlich. Der ganze Fragenkomplex der Plastideneiweißkristalle wird in einer weiteren Arbeit behandelt werden.

Zusammenfassung

In den Blatt- und Blütenzellen von *Phajus grandifolius* wurden Eiweißspindeln und anders gestaltete Proteinkristalloide gefunden. Da in den Zellen auch protoplasmatische x-Körper vorkommen und da die Eiweißkristalloide in ihrem Aussehen und mikrochemischen Verhalten ganz den kristallinen Einschlusskörpern anderer viruskranker Pflanzen gleichen, darf angenommen werden, daß die Proteinkristalle im Cytoplasma von *Phajus grandifolius* keine normalen Zellkörper sondern Viruseinschlüsse sind.

Eiweißspindeln wurden auch in den Blättern von *Cattleya labiata* angetroffen. Es wird vermutet, daß die bisher schon bekannten Proteinkristalle im Cytoplasma der Orchideen ebenfalls nur in viruskranken Pflanzen vorkommen. Dies ist schon deshalb wahrscheinlich, weil die in Gewächshäusern kultivierten Orchideen häufig unter Virose leiden.

Literatur

- Brat, L., G. Kenda und F. Weber, 1951: Rhabdoide fehlen den Schließzellen von *Drosera*. *Protoplasma* 40.
- Eicke, R., und E. Köhler, 1945: Beobachtungen an den Eiweißkristallen der Kartoffelsorte „Juli“. *Protoplasma* 58.
- Fedotina, W. L., 1957: Über die Natur der kubischen Eiweißkristalle in den Kartoffelknollen. *Iswest. Akad. Nauk UdSSR (Ruß.)*.
- Hölzl, J., und E. Bancher, 1958: Über die Eiweißkristalle von *Solanum tuberosum*. *Österr. bot. Z.* 105.
- Köhler, E., und M. Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. In: Sorauers Hdb. Pflanzenkrankheiten. Berlin und Hamburg.
- Meyer, A., 1882: Über Chlorophyllkörner, Stärkebildner und Farbkörper. *Bot. Cbl.* 12.
- 1920: Analyse der Zelle, I. Jena.
- Mikosch, C., 1890: Über ein neues Vorkommen geformten Eiweißes. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 8.
- Miličić, D., und Z. Udjbinac, 1960: Die Eiweißkristalle von *Capsicum annum* sind Viruskörper. *Protoplasma* 52.
- Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 5.
- Nestler, A., 1906: Myelin und Eiweißkristalle in der Frucht von *Capsicum annum*. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl. 115 (1).
- Rosenzopf, E., 1951: Sind Eiweißspindeln Viruseinschlusskörper? *Phyton* 3.
- Schimper, A. F. W., 1885: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Z.* 8.
- Smith, K. M., 1957: *Plant virus diseases*. 2. ed. London.
- Thaler, I., 1954: Eiweißspindeln von *Valerianella*. *Österr. bot. Z.* 101.

- Weber, F., 1954: Sind alle Pflanzen mit Cytoplasma-Eiweißspindeln Virusträger? *Phyton* 5.
- und G. Weber, 1959: Viruskristalle in *Listera cordata*? *Phyton* 8.
- Wehrmeyer, W., 1959: Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Struktur von Tabakmosaikvirus-Einschlußkörpern unter besonderer Berücksichtigung der fibrillären Formen. *Protoplasma* 51.
- Withner, C. L., 1959: *The Orchids*. New York.
- Zimmermann, A., 1895: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, I. Tübingen.

Elektive Vitalfärbung der Sekretidioblasten von *Helianthus annuus*

Von

Oswald Kiermayer

Aus der Biologischen Forschungsabteilung der Österreichische Stickstoffwerke AG.,
Linz a. d. Donau (Leiter Prof. Dr. H. Linser)

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 31. März 1960)

Bei den Kompositen bilden die Ligulifloren (Cichoriaceen) Milchsafröhren aus, während die Tubulifloren, zu welchen die *Heliantheae* gehören, mit Ölgängen ausgestattet sind. Diese Sekretgänge entstehen aus der Mutterzellschicht der Endodermis und liegen in der primären Rinde vor oder zwischen den Gefäßbündeln. Sie stellen meist Interzellularräume zwischen einer Gruppe von Ölidioblasten dar, welche ätherische Öle im Plasma bilden und diese durch die Zellwand in den schizogen entstandenen interzellulären Gang sezernieren. Neben *Helianthus* finden sich derartige Gänge bei *Centaurea*, *Chrysanthemum*, *Cirsium*, *Matricaria*, *Petasites*, *Senecio* u. a. in verschiedener Weise ausgebildet und angeordnet (Guttenberg 1951).

Auf Abb. 1 a ist die Gruppierung solcher Ölgänge oberhalb der Gefäßbündelscheide in der primären Hypocotylrinde von *Helianthus annuus* erkenntlich und auf Abb. 1 b sind die den Ölgang umgebenden Idioblasten bei starker Vergrößerung deutlich sichtbar. Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist ein solcher Sekretgang stets von mehreren (meist 4–5) kleineren Zellen umgeben, die sich gegen den Ölgang hin verschmälern, so daß jede Zelle für sich dadurch eine mehr oder minder dreieckige Gestalt erlangt. Diese 4–5 zugespitzten Zellen schließen in ihrem gemeinsamen Berührungspunkt nicht vollständig zusammen, sondern lassen einen Interzellularraum frei, der für die Aufnahme des Sekretes dient. Während im Hypocotyl stets mehrere solcher Ölgänge mit ihren dazugehörigen Idioblastenzellen jeweils oberhalb eines jeden Gefäßbündels anzutreffen sind, findet man im Epicotyl dort meist nur mehr einen einzigen von den Sekretzellen umschlossenen Ölgang. Solche einzelne Gänge finden sich im Epicotyl nicht nur (wie beim Hypocotyl) oberhalb der Gefäßbündel, sondern auch zwischen denselben verstreut vor.

Seit langem bekannt ist die Eigenschaft von Idioplastenzellen Vitalfarbstoffe elektiv zu speichern. So lassen sich beispielsweise Schließzellen (Pekarek 1953), Hydropoten bei Wasserpflanzen (Drawert 1958), Nektarien (Pekarek 1928), Drüsenhaare sowie Gerbstoffidioplasten (z. B. Strugger 1949) u. a. elektiv mit Vitalfarbstoffen färben.

Andererseits gibt es aber eine ganze Reihe von Idioplasten, welche gerade umgekehrt gegenüber ihrem stark tingierbaren angrenzenden Gewebe mit Vitalfarbstoffen keine Färbung annehmen. So bleiben beispielsweise die Raphidenzellen von *Haemaria discolor* mit Neutralrot ungefärbt (Dis-

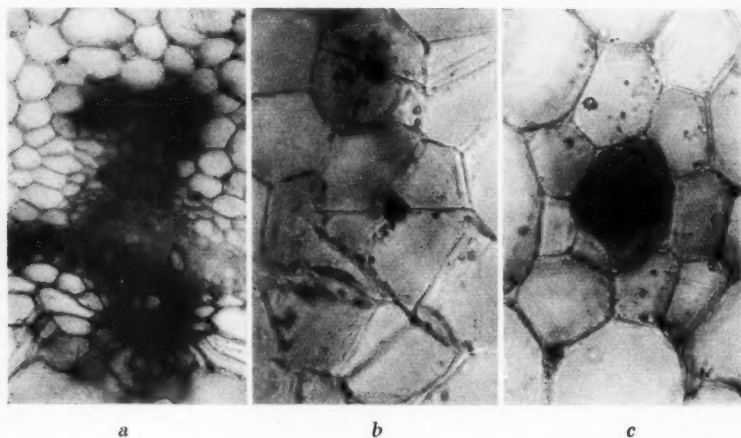


Abb. 1. Teilansicht von Querschnitten durch den Stengel von *Helianthus annuus*. *a* Hypocotylschnitt mit Neutralrot (1 : 6000, pH um 7,2) gefärbt; über der Gefäßbündelscheide sind die stark dunkel (violettrot) gefärbten Idioplastenzellen der Ölgänge erkennbar. *b* Idioplastenzellen mit violettrot gefärbtem Ölgang. *c* Epicotylschnitt mit nur einer Idioplastengruppe. Die ölsezernierenden Zellen sind mit Neutralrot (1 : 6000, pH um 7,2) violettrot, der aus dem interzellulären Ölgang ausgetretene Tropfen ist intensiv violettrot gefärbt.

kus und Kiermayer 1954) und auch die Ölioplasten von *Houttuynia cordata* lassen sich mit Vitalfarbstoffen nicht tingieren (Ziegler 1960).

Es war daher von Interesse zu untersuchen, welchem Typus die Sekretidioplasten im Stengel von *Helianthus annuus* angehören, d. h. ob sie zu jenen Idioplasten gehören, welche Vitalfarbstoffe elektiv speichern oder zu der Gruppe, welche sich überhaupt nicht tingieren lassen.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden aus dem Hypocotyl und Epicotyl ca. vier Wochen alter Keimlinge von *Helianthus annuus* dickere Querschnitte mit Hilfe einer Rasierklinge herausgeschnitten. Mehrere solche Schnitte wurden am Objektträger mit den jeweiligen Farblösungen versetzt. Als Vitalfarbstoffe kamen Neutralrot (Fa. Riedel de Haen) in einer Ver-

dünnung 1 : 6000 (gelöst in Linzer Leitungswasser; pH 7,2—7,5) und Brillantkresylblau (Fa. Merck, 1 : 8000, pH 9,8—10,1) zur Verwendung.

Hypocotylschnitte, welche mit der genannten Neutralrotlösung versetzt wurden, zeigten schon 5 bis 10 Minuten nach dem Farbzusatz typische Färbilder: Und zwar waren die Vakuolen der Zellen der primären Rinde und die Markzellen stets dunkel orange rot gefärbt, während die Idioblastenzellen um jeden Ölgang herum eine intensiv violettrote Zellsaftfärbung aufwiesen. Der Farbton entsprach dabei jenem von „vollen“ Zellsäften (Höfler 1947). Außer den Idioblastenzellen selbst, waren auch die aus dem Ölgang ausgetretenen Öltropfen intensiv violettrot gefärbt (vgl. Abb. 1 b). Es ist daher wahrscheinlich, daß die violette Zellsaftfärbung der Sekretzellen vom Vorhandensein des ätherischen Öles in der Zellsaftflüssigkeit herrührt, zumal sich auch das extrazelluläre Sekret violettrot färbte. Bei den Exkretidioblasten von *Helianthus annuus* könnte somit möglicherweise ein ätherisches Öl die Ursache „voller“ Zellsäfte sein.

Ungefähr eine Stunde nach der Farbzugabe konnte an den Schnitten eine allmähliche Entfärbung der vorerst orangeroten Rindenzellen beobachtet werden. Dafür trat nun eine auffallend starke orangerote Zellsaftfärbung in einer einzigen Zellschicht, und zwar in der oberhalb der Gefäßbündel verlaufenden Endodermis in Erscheinung. Dieses Phänomen könnte so gedeutet werden, daß der pH-Wert des Zellsaftes der Rindenzellen höher liegt als jener der Endodermiszellen, so daß bei den erstgenannten Zellen nach längerem Aufenthalt der Schnitte im Wasser eine Exosmose des Neutralrots auf Grund der schwächeren „Ionenfalle“ eintritt als in der Endodermis. Das würde bedeuten, daß die Endodermiszellen möglicherweise einen saureren Zellsaft besitzen als die Rindenzellen. An Querschnitten, welche bereits längere Zeit nach der Einfärbung in Leitungswasser lagen, waren somit, abgesehen von der Zellwandfärbung der toten mechanischen Elemente, zwei Gewebefärbungen besonders auffallend, nämlich die intensiv orangerote Zellsaftfärbung der Endodermis und die intensiv violettrote Zellsaftfärbung der Sekretidioblasten.

Nachfolgend soll ein Färbeprotokoll, aus welchem der zeitliche Verlauf der Neutralrotfärbung ersichtlich ist, wiedergegeben werden.

Objekt: *Helianthus annuus*, Querschnitt durch die Hypocotyl-Basis.

Farbstoff: Neutralrot 1 : 6000, Linzer Leitungswasser (pH 7,2—7,5), Färbung am Objektträger.

13^h 40: Einlage eines Querschnittes in die Farblösung.

13^h 41: Epidermis mit Krümelspeicherung, Rotorange-Färbung der toten Zellwände; Festigkeitselemente der Gefäße rotorange gefärbt; die aus den „Ölgängen“ ausgetretenen Tropfen rosarot gefärbt.

13^h 42: Einige Rinden- und Markzellen mit orangeroter Zellsaftfärbung, gelegentlich mit kleinen roten Krümeln. Krümelspeicherung vor allem in den subepidermalen Zellen.

13^h 43: Intensive Violett färbung der „Öltropfen“; deutliche violettrote Zellsaftfärbung der den „Ölgang“ umgebenden Zellen (Idioblastenzellen).

13^h 45: Deutlicher Unterschied in der Zellsaftfärbung der Rinden- und Markzellen und der Idioblastengruppen: Erstere sind hell- bis dunkelorange, die letzteren dagegen intensiv violettrot. In den violettroten Zellen häufig kleine rote Entmischungskugeln. Die ausgetretenen Tropfen sind intensiv rotviolett gefärbt, ihre Form ist nicht immer kugelförmig, sondern sie zeigten mannigfaltige tropfenförmige Gestalten.

13^h 49: Gegenüber 13^h 45 kein Unterschied.

13^h 51: Der Schnitt wird in etwa 20 ccm Leitungswasser übertragen und etwa 1 Minute lang stark geschüttelt.

13^h 54: Der Schnitt wird am Objektträger in Leitungswasser eingelegt.

13^h 56: Nahezu alle „Öltropfen“ verschwunden; die violettroten Idioblastenzellen enthalten kleine oder größere rote Entmischungskugeln. Die einzelnen Zellen einer Idioblastengruppe sind unterschiedlich stark gefärbt (einige zeigen Vakuolenkontraktion). Durch das Schütteln des Schnittes in Wasser wurden die „Öltropfen“ weggespült, was zeigt, daß der Großteil der Tropfen aus dem „Ölgang“ ausgetreten war.

14^h 03: Der Unterschied zwischen den orangeroten Rinden- und Markzellen und den violettroten Idioblastenzellen ist weiterhin sehr deutlich.

14^h 47: Eine große Anzahl der früher orangerot gefärbten Rindenzellen ist farblos oder nur mehr schwach orangerot gefärbt, dafür zeigt nun eine einzige, oberhalb der Gefäßbündel verlaufende zusammenhängende Zellreihe (Endodermis!) eine intensiv orangerote Färbung. Die intensiv violettrot gefärbten Idioblasten sind in der jetzt farblosen Rinde noch auffälliger.

15^h 02: Gegenüber 14^h 47 kein deutlicher Unterschied. Abbruch des Versuches.

Auch bei Vitalfärbung der Stengelquerschnitte mit Brillantkresylblau trat der Unterschied zwischen Rindenzellen und den Sekretidioblasten auffallend zutage: Während die Rindenzellen schon nach kurzer Färbedauer eine blaue violette Zellsaftfärbung annahmen, färbten sich die Vakuolen der Sekretidioblasten grünblau an. So wie die oben beschriebene violettrote Vakuolenfärbung mit Neutralrot, deutet auch die grünblaue Zellsaftfärbung mit Brillantkresylblau auf „volle“ Zellsäfte der Idioblasten hin. Eine gleiche, jedoch intensivere grünblaue Anfärbung zeigten auch die aus dem Ölgang ausgetretenen Tropfen.

Zusammenfassung

Die in der primären Rinde des Hypocotyls bzw. Epicotyls von *Helianthus annuus* gelegenen Sekretidioblasten konnten mit Neutralrot oder Brillantkresylblau elektiv gefärbt werden. Und zwar färbten sich die Zellsäfte lebender Sekretzellen mit Neutralrot violettrot, mit Brillantkresylblau grünblau an. Auf Grund dieser Färbebilder kann angenommen werden, daß die Idioblasten „volle“ Zellsäfte besitzen. Nachdem auch das aus dem Ölgang ausgetretene extrazelluläre Öl eine violettrote bzw. grünblaue Färbung zeigte, scheint es möglich, daß der spezielle Zellsaftfarbton der ölsezernierenden Idioblasten auf dem Vorhandensein eines ätherischen Öles beruhen könnte. Als Ursache für „volle“

Zellsäfte könnten demnach möglicherweise auch gewisse ätherische Öle angesehen werden.

Bei neutralrotgefärbten Schnitten konnte nach längerem Aufenthalt in Leitungswasser eine Entfärbung der Vakuolen der Rindenzellen, dagegen eine intensive orangerote Zellsaftfärbung der Endodermiszellen beobachtet werden. Dieser Unterschied liegt möglicherweise an einem verschiedenen pH-Wert der Zellsäfte der Rindenzellen und der Endodermiszellen.

Literatur

- Diskus, A., und O. Kiermayer, 1954: Die Raphidenzellen von *Haemaria discolor* bei Vitalfärbung. *Protoplasma* 43, 450.
- Drawert, H., 1938: Elektive Färbung der Hydropoten an fixierten Wasserpflanzen. Ein Beitrag zur protoplasmatischen Anatomie fixierter Gewebe. *Flora (Jena)* 132, 234.
- Guttenberg, H. v., 1951: Lehrbuch der Allgemeinen Botanik. Akad. Verlag, Berlin.
- Höfler, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? *Mikroskopie* 2, 13.
- Pekarek, J., 1929: Vitalfärbung von Nektarien. *Kolloidchem. Beih.* 28, 353.
- 1935: Über die Aciditätsverhältnisse in den Epidermis- und Schließzellen bei *Rumex acetosa* im Licht und im Dunkeln. *Planta* 21, 419.
- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Ziegler, A., 1960: Zur Anatomie und Protoplasmatik der Ölioblasten von *Houttuynia cordata*. *Protoplasma* 51, 539.

Die Feinstruktur der Plastiden von *Tradescantia albiflora* (Kth.) bei Eisenmangelchlorose¹

I. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Von

Ingrun Lamprecht

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster/Westfalen

Mit 28 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. April 1960)

Einführung

Chlorosen haben für die gärtnerische und landwirtschaftliche Praxis weitreichende Bedeutung und sind für viele wichtige Kultur- und Nutzpflanzen beschrieben worden (Wallace 1944, Bear 1949, Maier-Geisenheim 1942). Sie lassen sich als pathologische Veränderungen des Assimilationsapparates der grünen Pflanzen charakterisieren, die verschiedene Ursachen haben können und sich in teilweiser Vergilbung oder vollständigem Ausbleichen der grünen Teile der betroffenen Pflanzen äußern. Diese Chlorosesymptome treten bei Eisenmangel besonders ausgeprägt in Erscheinung, und so erklärt es sich, daß die Eisenmangelchlorose als eine der ersten Mangelkrankheiten ursächlich erkannt wurde. Seit der Entdeckung E. Gris' im Jahre 1843, daß chlorotische Pflanzen durch Behandlung mit Eisensalzen erneut zum Ergrünen gebracht werden können, ist die Eisenmangelchlorose in zahlreichen Arbeiten untersucht worden; dabei wurden insbesondere die Problemkreise der Photosynthese einerseits und der Eisenwirkung andererseits berücksichtigt.

Untersuchungen über den Aufbau des Chlorophyllmoleküls und über wesentliche Stufen der Chlorophyllsynthese seitens der Biochemie (Fischer, Willstätter, Stoll, Granick u. a.) erbrachten den Nachweis, daß eine direkte Beteiligung des Eisens am Chlorophyllaufbau nicht stattfindet (Pirson 1958, S. 369; Vgl. hierzu Lamprecht 1961 b). Weitere Untersuchungen ergaben, daß bei Eisenmangel neben der Senkung des Chlorophyllgehaltes eine fast ebenso starke Minderung der Carotinoid-

¹ Vorgetragen auf der Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Klagenfurt, Mai 1959.

gehalte eintritt (Burghardt 1956), daß Assimilation und Atmung gegenüber Kontrollen stark absinken (Burghardt 1956) und daß der Stickstoffhaushalt eine Verschiebung zugunsten von Eiweißspaltprodukten erfährt (Holley und Cain 1955, DeKock und Morrison 1958a). Außerdem wurden Änderungen in der Säurezusammensetzung (McGeorge 1949, DeKock und Morrison 1958b) und im Eisenstatus (Liebich 1941, McGeorge 1949, Erkama 1950, Weinstein und Robbins 1955, DeKock 1956) sowie eine Minderung der Enzymaktivitäten der eisenenthaltenden Fermentsysteme — Katalase, Cytochrome und Peroxydase — festgestellt (Brown und Hendricks 1952, Nason, Oldewurtel und Probst 1952, Weinstein und Robbins 1955).

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich eine viel allgemeinere Einwirkung des Eisens auf den Assimilationsapparat der grünen Pflanzen, als ursprünglich angenommen worden war; sie steht offensichtlich in komplexem Zusammenhang mit dem gesamten Stoffwechsel der Pflanzenzelle.

Es ist daher erstaunlich, daß die eigentlichen Träger der Photosynthese, die Chloroplasten, bei diesen Untersuchungen kaum oder gar nicht berücksichtigt wurden. Bei Griessmeyer (1930) findet sich lediglich ein Hinweis auf sehr kleine und blasse Plastiden in den Zellen chlorotischer, eisenfrei aufgezogener Pflanzen. Abgesehen davon sind in der Literatur nur wenige Arbeiten bekannt, die sich mit der Plastidengarnitur eisenmangelkranker Pflanzen befassen.

Die ersten gründlichen Untersuchungen an Plastiden eisenmangelkranker Pflanzen unternahm im Jahre 1857 A. Gris, der Sohn des Entdeckers der Eisenmangelchlorose; seine Vorstellungen hinsichtlich der Entwicklung der Chloroplasten ließen sich jedoch mit der Lehre von der Kontinuität der Plastiden (Schimper 1883, 1885 und Meyer 1883) nicht vereinbaren und wurden daher 1893 von Zimmermann revidiert. Nach A. Gris sollen geformte Farbstoffträger in chlorotischen Zellen vollständig fehlen; bei Ergrünungsversuchen sollen die Chloroplasten neu aus einer gelblichen, körnigen plasmatischen Masse in unmittelbarer Kernnähe entstehen. Zimmermann (1893) konnte dagegen an verschiedensten Objekten zeigen, daß in noch ergrünungsfähigen eisenmangelkranken Zellen stets scharf umrissene Plastiden deutlich erkennbar vorhanden sind; allerdings sind sie sehr viel kleiner als in grünen Geweben und zartgelb oder völlig farblos.

Frey-Wyssling, Ruch und Berger (1956) beschrieben die Plastiden kalkchlorosekranker Pflanzen an Hand lichtmikroskopischer Untersuchungen. Die chlorotischen Plastiden enthielten zwar geringe Mengen Chlorophyll, es fehlte ihnen jedoch die normale Granendifferenzierung. „Das Dogma, die Chlorose sei lediglich durch die fehlende Chlorophyllsynthese bedingt, bedarf daher einer Überprüfung; denn dieser Mangel kann theoretisch ebensogut die Folge wie die Ursache der fehlenden Granendifferenzierung sein. ... Da nämlich die Granen das grüne Chromolipoprotein des Chloroplasten enthalten ... könnte die Chlorose ebensogut durch eine mangelhafte Synthese des spezifischen Lipoproteids, an welches das Chlorophyll gebunden wird, verursacht sein“ (Frey-Wyssling et al. 1956).

Die Feinstruktur erwachsener Chloroplasten und ihre Entwicklung aus Proplastiden ist in den letzten 20 Jahren licht- und elektronenmikroskopisch eingehend untersucht worden (Heitz 1937, 1954; Menke 1940; Frey-Wyssling und Mühlethaler 1949; Frey-Wyssling und Steinmann 1953; Steinmann und Sjöstrand 1955; Strugger 1950, 1951, 1953, 1954 a, b, 1956 a, 1957 a, b; Strugger und Perner 1956; Perner 1956 a, b; Cohen und Bowler 1953; Leyon 1954 a, b, c; Sager und Palade 1954, 1957; Kaja 1954 a, b, 1957; Grave 1954; Hodge, McLean und Mercer 1955; Böing 1955; Fasse-Franzisket 1956; Mühlethaler 1956; Stubbe und v. Wettstein 1956; v. Wettstein 1957 a, b; Spiekermann 1957; Sitte 1958; Buvat 1958; Haber 1959; Menke 1959 u. a.). Es ist die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen, von diesen neueren Grundlagen ausgehend die Strukturänderungen somatischer Plastiden unter dem Einfluß zunehmender Eisenmangelchlorose licht- und elektronenmikroskopisch zu analysieren. Ein Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit Erkenntnissen aus physiologischen und genetischen Untersuchungen führt zu einer Erörterung der Frage, in welcher Weise das Eisen an der Ausbildung des Chlorophylls und des Feinbaues der Chloroplasten beteiligt ist.

Material und Methode

Es wurden Stecklinge einer rein grünen Form von *Tradescantia albiflora* (Kth.) verwendet, die unter gleichbleibenden Bedingungen im Farnhaus des Botanischen Gartens der Universität Münster auf halbschattigen Stellagen in Blumentöpfen angezogen wurden. Als Nachkommen derselben Mutterpflanze stellten sie ein einheitliches Material dar. Für die Kulturen fanden Sproßspitzen mit je vier vollentfalteten Blättern Verwendung, an denen ein Knoten nach Entfernung eines 5. Blattes für die Bewurzelung stehengelassen wurde.

Als Kulturgefäße dienten Dreiliter-Gefäße aus Jenaer Glas G 20 (Schott & Gen.). Die Nährlösung, für die ausschließlich Substanzen „pro analysi“ der Firmen Merck und Riedel-de Haën und destilliertes H_2O aus einer Quarzanlage bzw. einem Säulenentsalzungsapparat benutzt wurden, hatte die von Burghardt (1956) angegebene Zusammensetzung einer variierten Dreisalzlösung nach Shive (1915):

I. $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$	1187,5 mg/l Nährlösung
II. KH_2PO_4	272 mg/l Nährlösung
H_3BO_3	5 mg/l Nährlösung
III. $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	241 mg/l Nährlösung
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	4,2 mg/l Nährlösung

Als Eisenquelle wurde das Eisenchelat der EDTA nach Jacobson (1951) verwendet, dessen Vorzüge Burghardt (1956) hervorhebt. Für die Kontrollen mit kompletter Nährlösung wurden 2 cm^3 Eisen-EDTA = 10 mg Fe/l 1 Nährlösung gegeben. Die Zugabe von EDTA erfolgte nach etwa 8 Tagen, wenn sich alle Pflanzen in genügendem Maße bewurzelt hatten; bei früherer Zugabe traten an den Blättern starke Nekroseschäden auf. Auf weitere Spurenelemente konnte verzichtet werden, da die Gesamtkulturdauer nur 8 bis 9, in den Wintermonaten bis zu 10 Wochen betrug und die Nährlösung nach einem Monat erneuert wurde.

Im Verlaufe von 2 Jahren (1956, 1957) wurden insgesamt 15 Kulturen heran-

gezogen, die jeweils 10 Gefäße mit 4 Pflanzen umfaßten. Drei Kontrollgefäße mit kompletter Nährlösung erhielten die angegebene Menge Eisen-EDTA, während die eigentlichen Eisenmangelpflanzen in sieben Parallelgefäßen völlig eisenfrei kultiviert wurden. Es zeigte sich, daß bei der sehr reichlichen Entwicklung der Tradescantien in beiden Reihen genügend Material für die mikroskopischen Untersuchungen zur Verfügung stand, und daß die Zahl der Parallelen zur Sicherstellung der typischen Ausbildung der Krankheitssymptome bei Eisenmangel ausreichend war. Die einzelnen Kulturen wurden im Abstand von 4 bis 5 Wochen angesetzt, so daß meist zwei Kulturen verschiedenen Alters ständig alle Stadien der Chloroseentwicklung aufwiesen. Die Anzucht der Tradescantien in Wasserkultur und die Ausbildung der Chlorosesymptome waren das ganze Jahr hindurch möglich, wobei sich lediglich in den Wintermonaten eine Verzögerung des Wachstums und damit auch der Chloroseausbildung einstellte. Die Pflanzen wuchsen bei normalem Tageslicht ohne zusätzliche künstliche Beleuchtung. Die Temperaturen in dem zur Anzucht benutzten Gewächshaus schwankten je nach der Jahreszeit zwischen 20° und 24° C. Die relative Luftfeuchtigkeit lag zwischen 40 und 75%.

Für die lichtmikroskopischen und fluoreszenzoptischen Untersuchungen stand ein Ortholux (E. Leitz, Wetzlar) mit Fluoreszenzausrüstung und Aufsatzkamera zur Verfügung. Die Mikrophotographien wurden mit einer Leica If und einem Mikroansatz in Verbindung mit dem Immersionsobjektiv Ol 100 : 1, n. A. = 1,30, einem Okular Periplan 10mal und einer Blau-Gelb-Filterkombination hergestellt und ausschließlich an lebendem Material aufgenommen. Die Vergrößerung aller Mikroaufnahmen beträgt einheitlich 1250 : 1.

Für die Vitalbeobachtungen wurde das Schwammparenchym herangezogen; einerseits bestehen zwischen den drei bei *Tradescantia* vorhandenen Mesophyllschichten in der Plastidenausstattung keine wesentlichen Unterschiede, andererseits sind die Plastiden in den großen flachen Zellen des Schwammparenchyms weitgehend an den zur Blattoberfläche parallelen Zellwänden anzutreffen. Als Kriterien für die Vitalität der Zellen galten Plasmaströmung und normales Aussehen von Zellkern, Plastiden, Chondriosomen und Sphärosomen sowie das Fehlen von Brownscher Molekularbewegung (Strugger 1954 b). Um die Giftwirkung reinen destillierten Wassers auszuschalten, wurde als eisenfreies Untersuchungsmedium ein Phosphatpuffer nach Strugger (1949, S. 134) verwendet (pH-Wert = 7). Nach der Infiltration und Entlüftung der Gewebe mit Hilfe eines Rezipienten und der Wasserstrahlpumpe konnten die Schnitte in diesem Medium oft viele Stunden lang beobachtet werden, ohne daß sichtbare Störungen der Vitalität auftraten. Auch der bei zuckerhaltigen Lösungen leicht eintretende Bakterienbefall wurde nicht beobachtet.

Die Vitalbeobachtungen an chlorotischen Plastiden wurden durch Untersuchungen über die Färbbarkeit der Plastidenkomponenten Stroma und Grana mit basischen Farbstoffen ergänzt. Nach den Erfahrungen von Strugger (1951, 1953, 1954 b) und seinen Mitarbeitern (Perner 1954, Grave 1954, Kaja 1954 a, b, 1956, Böing 1955, Bartels 1955, Fasse-Franzisket 1956, Spiekermann 1957, Haber 1959) zeichnen sich die Grana erwachsener Chloroplasten und die Primärgrana von Proplastiden und Leukoplasten — also die lamellar aufgebauten Komponenten der Plastiden — durch eine starke Affinität zu basischen Farbstoffen aus. Auch die Granascheibchen in den albicaten Plastiden panaschierter Pflanzen (Strugger und Losada-Villasante 1956) und die großen Grana etiologierter Plastiden verschiedener Mono- und Dikotylen (Strugger und Kriger 1960) zeigen die gleiche starke Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen; besonders gute

Resultate erzielten Strugger und Kriger mit Säurefuchsin nach Altmann und mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain.

In der Färbbarkeit von Plastideneinschlüssen mit basischen Farbstoffen ist somit eine Nachweismöglichkeit für die Grananat- und den Lamellenaufbau dieser Einschlüsse gegeben. Entsprechende Untersuchungen chlorotischer Plastiden wurden an fixiertem Material durchgeführt, das für Paraffinschnittserien in der üblichen Weise vorbereitet wurde: Fixation und Entwässerung in der Alkoholreihe bis zur Stufe des absoluten Alkohols entsprechen der Methodik für elektronenmikroskopische Präparate (Lamprecht 1961 b); über Methylbenzoat und Benzol gelangten die Objekte in Paraffin. Die Mikrotomschnittserien wurden, den Erfahrungen Struggers und Krigers (1960) folgend, mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain angefärbt (Romeis 1948, § 672). Vom schwach bläulich gefärbten Stroma heben sich die Grana bei guter Differenzierung tief dunkelblau bis schwarz ab. Die Osmiumsäure bedingt eine die Färbung störende Schwärzung der Präparate. Die Schnitte wurden daher vor der Färbung mit H_2O_2 gebleicht (Romeis 1948, § 1013). Eine Quellungsbehandlung mit 1% KOH (Strugger 1951) verdeutlichte die Granastrukturen ausgewachsener Chloroplasten, blieb aber bei chlorotischen Plastiden ohne sichtbaren Erfolg.

Die Ausbildung der makroskopisch sichtbaren Chlorosesymptome bei Eisenmangel

1. Beobachtungen an Kontrollpflanzen

In kompletter Nährlösung zeigen die Kontrollpflanzen nach der Bewurzelung lebhaftes Wachstum. Schon 1–2 Tage nach Kulturbeginn haben alle Stecklinge an den blattfreien Knoten Adventivwurzeln ausgebildet, die im Verlauf einer Woche etwa 7–10 cm lang werden, so daß die Pflanzen die Zugabe von Eisen-EDTA zu diesem Zeitpunkt ohne Schädigungen überstehen. — Die neugebildeten Blätter sind glänzend dunkelgrün und kräftig bei durchschnittlich 50–65 mm Länge und 25–30 mm Breite; die Internodien sind gestreckt und dunkelgrün; die Wurzeln sind lang und dünn und durch einen Niederschlag von Eisen-EDTA braun gefärbt (Baumeister 1958, S. 537). Das Längenwachstum der Adventivwurzeln ist gegenüber der Ausbildung von Seitenwurzeln eindeutig vorherrschend (Abb. 1). Nach 8–10 Wochen Kulturdauer treten an den Tradescantien Alterungserscheinungen auf; die älteren Blätter und Wurzeln sterben ab, während die jüngeren Blätter braunfleckig werden und, zumeist an den Blattspitzen und -rändern, verdorren. Für die Untersuchungen wurden jedoch nur vollkommen gesunde und kräftige Pflanzen herangezogen.

2. Beobachtungen an Eisenmangelpflanzen

Als charakteristische Eisenmangelerscheinungen werden in der Literatur örtlich begrenzte chlorotische Verfärbungen der jüngsten Blätter von Hellgrün bis Weiß bei grünbleibenden Nerven und Erhaltung der Terminalknospe angegeben (Molisch 1892, Schropp 1934, 1951, Maier-Geisenheim 1942, Bear 1949, Wallace 1951, Burghardt 1956). Diese Symptome konnten für Tradescantia bestätigt werden.

Die Stecklinge entwickelten sich auch in der Eisenmangelösung sehr

üppig; das Wachstum der Mangelpflanzen entspricht über lange Zeit dem Wachstum der Kontrollen, jedoch macht sich bald eine zunehmende Stau-



Abb. 1. *Tradescantia albiflora*. Kulturgefäß mit Kontrollpflanzen in kompletter Nährlösung.

Abb. 2. *Tradescantia albiflora*. Kulturgefäß mit Versuchspflanzen in eisenfreier Nährlösung nach 7 Wochen Kulturdauer.

chung der Internodien und eine fortschreitend kleinere Ausbildung der neu entstehenden Blätter bemerkbar. Die letzten, vollkommen chlorotischen

Blätter erreichen kaum mehr die halbe Länge der Kontrollen. Die Wurzeln der Eisenmangelpflanzen unterscheiden sich ebenfalls wesentlich von denen der Kontrollen: sie zeigen eine ungewöhnlich reiche Ausbildung von Seitenwurzeln und sind fast in ihrer gesamten Länge von einem regelrechten Haarpelz umgeben, während normal ernährte Pflanzen nur kurze Wurzelhaarzonen besitzen (Abb. 2). Mikroskopische Kontrollen ergaben, daß die Rhizodermis dieser Wurzeln nur noch aus Trichoblasten besteht; alle Rhizodermiszellen sind in ein langes Wurzelhaar ausgewachsen. Abweichend von Angaben in der Literatur (Schropp 1951, Burghardt 1956) sind die Wurzeln des hier benutzten Objektes, *Tradescantia albiflora*, im funktionsfähigen Zustand in Eisenmangellösungen schneeweiß; eine Braunfärbung tritt erst mit dem Absterben der älteren Wurzeln auf.

Bei anhaltendem Eisenmangel entwickelt sich jedes neu gebildete Blatt stärker chlorotisch als das nächstältere und behält seine Färbung unter gleichbleibenden Bedingungen bis zum Absterben bei. Das spricht dafür, daß das einmal beim Aufbau des Assimilationsapparates festgelegte Eisen (nach Liebig 1941 sind 82% des Gesamteisens der Pflanzenzellen in den Chloroplasten lokalisiert) aus lebendem Gewebe nicht wieder mobilisiert und den Meristemen zugeführt werden kann (Bear 1949, S. 37; Wallace 1951, S. 12, S. 26; Baumeister 1958, S. 537).

Ausgehend vom Normaltyp lassen sich zehn charakteristische Typen der Vergilbung bei Eisenmangel unterscheiden, die im folgenden mit römischen Ziffern bezeichnet werden (Abb. 3). Die Stufen der Farbaufhellung, die bei der Beschreibung der Typen angeführt werden, entsprechen dem zunehmenden Chlorosegrad des Gewebes:

dunkelgrün — lebhaft grün — hellgrün — zartgrün — gelblichgrün — gelblich — hellgelb — zartgelb — farblos (vgl. A. Meyer 1918).

Normaltyp:

I Blatt einer Kontrollpflanze, gleichzeitig Typ der vor Kulturbeginn entfalteten Blätter; groß und kräftig, saftig dunkelgrün mit lebhaft glänzender Oberfläche.

Vergilbungstypen:

- II Erste Chloroseanzeichen: Aufhellung der Intercostalfelder (IF), von denen die Nervenzonen (N, die den längsverlaufenden Hauptnerven unmittelbar benachbarten Mesophyllgewebe) dunkelgrün abgesetzt sind; die Vernetzung der Nervenzonen durch die ebenfalls dunkelgrünen Zonen der Quernervatur bewirkt ein mosaikartiges, gefeldertes Aussehen dieses Blatttyps. Oberfläche glänzend.
- III Die Kontraste von N und IF sind verwischt; keine Quervernetzung der Parallelnervatur. N lebhaft grün bis dunkelgrün; IF gelblichgrün bis hellgrün.
- IV N lebhaft grün, an der Basis aufgehellt; IF basal gelblichgrün, von der Mitte zur Spitze hin zunehmend hellgrün bis lebhaft grün. Blatt (wie bei allen folgenden Vergilbungstypen) starr, Oberfläche ohne Glanz.
- V N hellgrün, basal aufgehellt; IF basal gelblich, zur Spitze zunehmend gelblichgrün.
- VI N an der äußersten Basis hellgrün, im Mittelteil gelblich, zur Spitze zunehmend hellgrün; IF hellgelb.

- VII Basis vollkommen einheitlich zartgelb; N erst vom zweiten Drittel an gelblich vom hellgelben Blattgrund abgehoben.
- VIII Blatt gelblich, N nur in den äußersten Basal- und Spitzenzonen zartgrün abgehoben.
- IX Blatt zartgelb, N nur in der Blattmitte hellgelb abgehoben.
- X Blatt völlig chlorotisch, zartgelb oder vollkommen farblos, höchstens wenige Millimeter der äußersten Spitze zartgrün gefärbt.



Abb. 5. Vergilbungstypen der Blätter von *Tradescantia albiflora* bei Eisenmangelchlorose (obere Reihe v.l.n.r.: I—V; untere Reihe v.l.n.r.: VI—X). Näheres im Text.

Die zehn beschriebenen Blatttypen folgen nicht alle unmittelbar an einem Sproß aufeinander; zum Beleg sind in der Tabelle 1 Protokolle über die Blattfärbung der Haupttriebe von Mangelpflanzen dreier Kulturen wiedergegeben. Vom 9. Blatt an entsprechen alle weiteren Blätter dem Typ X, sie werden aber in ihrem Flächenwachstum immer stärker gehemmt, bis sich nach etwa 10 Wochen Degenerationerscheinungen auch äußerlich bemerkbar machen: die Blätter werden glasig oder bekommen trockene braune Flecke, die Knospen sterben schließlich ganz ab.

3. Sekundäre Ergrünungserscheinungen

Eine Komplikation im Chlorosebild entsteht durch den Umstand, daß ohne Zugabe von Eisen eine Ergrünung der chlorotischen Blätter auftreten kann. Nach 7 bis 8 Wochen Kulturdauer beginnen die obersten und damit

jüngsten chlorotischen Blätter (X) von der Basis her dunkelgrün zu werden (Abb. 4). Es sind davon zunächst das letzte und das vorletzte voll entfaltete Blatt unter der Knospe betroffen; später können auch die nächstälteren noch ergrünen. Die Ergrünung schreitet in breiter, scharf abgegrenzter Front bei sehr schmaler Übergangszone zwischen chlorotischem und schon ergrünem Gewebe von der Blattbasis aus spitzwärts fort. Nerven und Interkostalfelder ergrünen gleichzeitig. Es ergibt sich dabei der Eindruck eines sehr plötzlichen starken Schubes von physiologisch aktivem Eisen, das die zunächst vollkommen chlorotischen Blätter zum Ergrünen bringt. Dieses

Tab. 1. Blattfärbung der Haupttriebe von Eisenmangelpflanzen.

Blatt Nr.	Blatttypen											
	Vor Kulturbeginn vorhanden				Unter der Einwirkung von Eisenmangel entfaltet							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kultur vom 11. 4. 1957 Gefäß 4 c 20 Tage	I	I	I	I	II	III	IV-V	—	—	—	—	—
Kultur vom 26. 1. 57 Gefäß 8 33 Tage 54 Tage							V-VI V-VI	VI VI	X X	X X	— X	— X
Kultur vom 20. 12. 1956 47 Tage 53 Tage	I I	I I	I I	I I	III III	IV IV	V V	VII VII	X X	X X	— X	— X

Eisen kann nur aus den etwa nach dieser Zeit absterbenden ältesten Blättern und Wurzeln stammen, aus denen es beim Degenerationsprozeß freigesetzt und in die Sproßspitzen geleitet wird; dort wird die bei Eisenmangelkultur eingetretene Hemmung in der Plastidenentwicklung aufgehoben, und die Plastiden ergrünen zu voll funktionsfähigen normalen Chloroplasten. Ist nach einiger Zeit das so frei gewordene Eisen für die Plastiden-ergrünung verbraucht, so entwickeln sich die danach neugebildeten Blätter wiederum wie vorher voll chlorotisch (X), bis das Wachstum ganz eingestellt wird und die Pflanzen absterben.

Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Struktur der Plastiden bei Eisenmangelchlorose

1. Die Plastiden erwachsener grüner Blätter von Kontrollpflanzen

Die Plastiden erwachsener grüner Blätter entsprechen den von Heitz (1936, 1937), Strugger (1950, 1951), Grave (1954), Böing (1955), Fasse-Franzisket (1956) und Mudrack (1956) mitgeteilten Befunden. In der Flächenansicht sind die Chloroplasten durchschnittlich $7 \times 8 \mu$ groß. Bei länglich-elliptischem bis annähernd kreisförmigem Umriss sind sie

dunkelgrün und ergeben im Blau- und UV-Licht eine starke Rotfluoreszenz (Eigenfluoreszenz des Chlorophylls). Sie besitzen zahlreiche stark lichtbrechende, auch ohne Vitalfärbung deutlich sichtbare Grana (Abb. 5), deren Chlorophyllfluoreszenz besonders intensiv ist. Jedoch fluoresziert auch das Stroma; dabei konnte nicht entschieden werden, ob es sich um Eigenfluoreszenz der Stromapartien oder um Überstrahlungen als Folge der Fluoreszenz von Chloroplasten aus Geweben in anderen optischen Ebenen handelt (Palisadenparenchym).

Fast zu allen Jahreszeiten sind die Chloroplasten der Kontrollpflanzen stärkehaltig. Schon ohne Färbung mit Jod-Jodkalium heben sich die linsenförmigen Stärkekörner durch ihr Lichtbrechungsvermögen vom Stroma deutlich ab und sind auch bei geringer Größe mit den Grana meist nicht zu verwechseln. Einen eindeutigen Nachweis liefert die Prüfung mit Jod-Jodkalium. Bei hohem Stärkegehalt kann die Stärke die Chloroplasten weitgehend deformieren und die Granastruktur vollkommen verdecken. Daher wurden die zu untersuchenden Objekte nach einer Prüfung auf ihren Stärkereichtum etwa 48 Std. lang in einen Dunkelraum mit konstanter Temperatur (20–22° C) gebracht. Der Abbau der Assimilationsstärke war nach diesem Zeitraum erfolgt, ohne daß sich Schädigungen an den Zellen nachweisen ließen (Abb. 6).

Die Zellkerne in normal ernährten Pflanzen sind feingranulär und besitzen einen etwas dunkler erscheinenden Nucleolus. In allen lebenden Zellen herrscht eine oft recht lebhaft Plasmaströmung. In den Zellsaftäumen finden sich häufig Calciumoxalat-Kristalle in den verschiedensten Formen ausgebildet. In abgestorbenen Zellen zeigen die Kristalle starke Brownsche Molekularbewegung.

2. Die Struktur der Plastiden bei zunehmender Eisenmangelwirkung

Der lebhaft grünen Färbung der ersten Blatttypen (II–IV) entsprechend, werden die Chloroplasten zu Beginn der Eisenmangelchlorose noch weitgehend normal ausgebildet. Zwar sind sie kleiner als gleichaltrige, den gleichen Blattzonen entstammende Chloroplasten aus Kontrollpflanzen, jedoch ebenfalls dunkelgrün und mit zahlreichen Granen versehen, die ohne Färbung deutlich erkennbar sind. Das Fluoreszenzbild entspricht demjenigen voll ausdifferenzierter Plastiden. In das Stroma eingelagert finden sich oft zwei bis mehrere Stärkekörner (Abb. 7).

Nach Behandlung mit Rhodamin B 1:10.000 in einem Phosphatpuffer (pH = 7, 15 min; Strugger 1949) heben sich die Grana der Plastiden dunkel vom leicht grau getönten Stroma ab. Die Färbung beruht auf einer elektiven Speicherung des elektroneutralen Farbstoffes durch die Lipidkomponenten der Chloroplasten in den Granen.

Bei anhaltendem Eisenmangel tritt mit der stärkeren Vergilbung der folgenden Blatttypen (V–IX) eine weitere Hemmung der Plastidenentwicklung ein. Das Strukturbild der Plastiden ist jedoch, gemäß der unterschiedlichen Verteilung der Farbstoffe auf der Spreite (V, VI, VII), je nach Schnitt-

stelle sehr verschiedenartig. So findet man im Mesophyll der hell- bis lebhaft grünen Blattspitzen von Blättern des Vergilbungstyps VI—VII (Blattlänge 36 mm, Schnitt 26—28 mm von der Blattbasis entfernt) stärkefreie, granareiche Plastiden, die in einzelnen Fällen eine große Vakuole aufweisen können (Abb. 8). Mittlere Größen dieser Plastiden: $5,8 \times 4,4 \mu$.

Dagegen besitzen die Mesophyllzellen der Blattmitte desselben Blattes (Schnitt 12—14 mm von der Blattbasis entfernt) in nervenfernen Zonen sehr kleine, stark reduzierte Plastiden. In einem chlorophyllfreien, schwach amöboiden Stroma weisen sie wenige, gelegentlich nur zwei dunkle, stark lichtbrechende, ebenfalls chlorophyllfreie Grana auf (Abb. 9). Mittlere Größen der Plastiden: $5,1 \times 2,9 \mu$.

Mit Jod-Jodkaliumlösung läßt sich leicht nachweisen, daß es sich bei diesen als Grana bezeichneten Einschlüssen der chlorotischen Plastiden nicht um Stärke handelt. Ihre Granatur im Sinne von Strugger (1957, 1950, 1953, 1954 a, b), Strugger und Losada-Villasante (1956), Grave (1954), Böing (1955), Fasse-Franzisket (1956) und Kriger (1957) kann mit Hilfe der Speicherung lipophiler Farbstoffe wie Rhodamin B (1 : 10.000, Phosphatpuffer vom pH = Wert 7, 20—30 min, vgl. Strugger 1949) nicht eindeutig festgestellt werden. Die Farbstoffaufnahme und -speicherung scheint in lebenden chlorotischen Geweben stark gemindert zu sein. In osmiumsäurefixiertem Material färben sich die Einschlüsse chlorotischer Plastiden mit Hämatoxylin (s. S. 122) stark an und können somit als Grana bezeichnet werden. Der Begriff Granum wird hier im weitesten Sinne zur Bezeichnung eines lamellar aufgebauten und lichtmikroskopisch distinkt abgegrenzten Bestandteils eines Plastids gebraucht, der sich durch sein Lichtbrechungsvermögen sowie durch seine Färbbarkeit mit lipophilen und basischen Farbstoffen auszeichnet. Die elektronenmikroskopische Analyse chlorotischer Plastiden wird zeigen, daß solche lamellaren Komponenten tatsächlich vorhanden sind.

Abb. 4. Sekundäre Egrünungserscheinungen an ehemals voll chlorotischen Blättern von *Tradescantia albiflora*.

Abb. 5 und 6. Erwachsene Chloroplasten aus dem Schwammparenchym der Blätter von Kontrollpflanzen (I), Abb. 6 nach 48 Std. Dunkelkultur. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 7. Chloroplasten aus dem Schwammparenchym eines Blattes vom Vergilbungstyp III nach 48 Std. Dunkelkultur. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 8. Stärkefreies, chlorophyllhaltiges Plastid mit zahlreichen Grana; Schwammparenchym der Spitze eines Blattes von Vergilbungstyp VI—VII. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 9. Chlorotisches, chlorophyllfreies Plastid mit zwei stark lichtbrechenden Grana; Schwammparenchym der Mitte desselben Blattes. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 10. Stärkeführende Plastiden aus der Basis eines Blattes vom Vergilbungstyp V; a unbehandelt; b Stärkenachweis mit $KJ \cdot J_2$. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

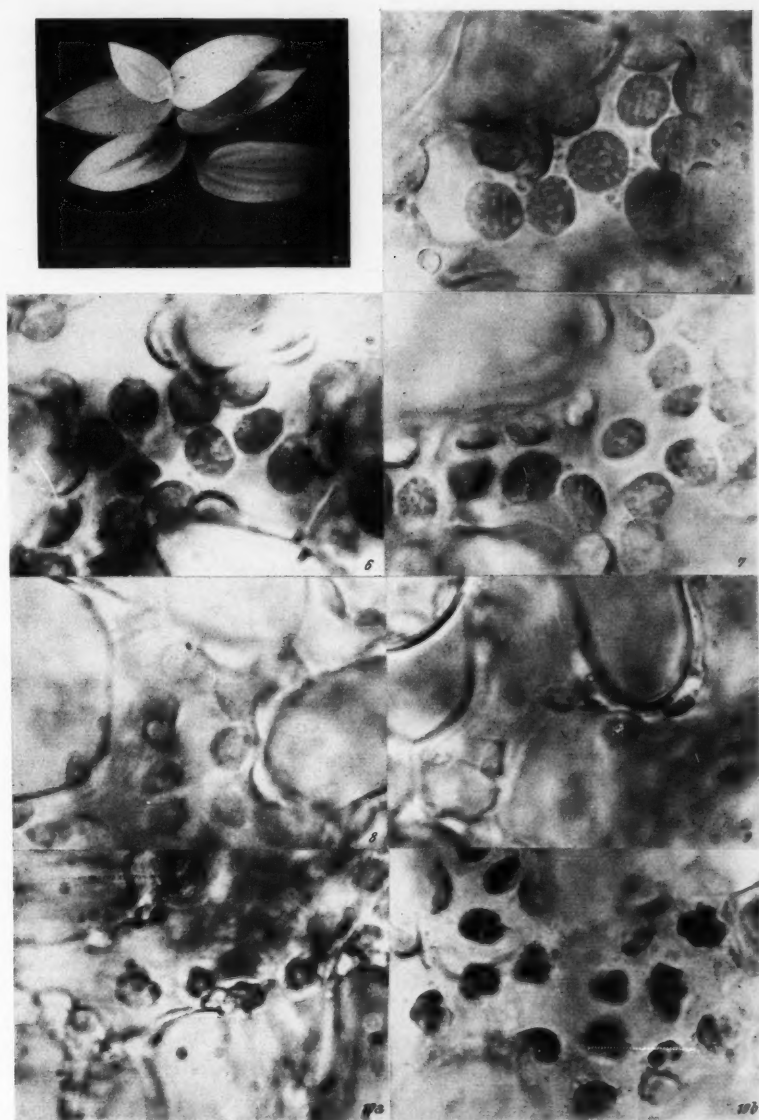


Abb. 4—10.

Die Plastiden aus den völlig farblosen Intercostalgeweben der Basis des auf S. 128 besprochenen Blattes (Schnitt 5—7 mm von der Blattbasis entfernt) sind gänzlich chlorophyllfrei und stark amöboid und besitzen 2—5 Grana. Mittlere Größen der Plastiden: $4,6 \times 2,8 \mu$. In solchen Mesophyllzellen, deren Plasma sich in lebhafter Strömung befand, fielen zahlreiche Calciumoxalat-Kristalle auf, die bei stark ausgeprägter Eisenmangelchlorose offensichtlich besonders reichlich gebildet werden.

Damit zeigt sich der schon äußerlich an der Blattfärbung sichtbare Gradient der Ausbleichung — von der Spitze zur Basis des Blattes zunehmend — auch an der Plastidengarnitur der entsprechenden Mesophyllgewebe, und zwar findet sich

1. in der Blattspitze eine weitgehende Formkonstanz der grünen, fast voll aus differenzierten Plastiden;

2. in der Blattmitte eine zunehmende Entwicklungshemmung der Plastiden, die sich vor allem auf die Granastruktur auswirkt;

3. in den Geweben der Blattbasis eine starke Reduktion und eine hohe Formvarianz infolge der Amöboidie der chlorotischen Plastiden.

So ist es auch verständlich, daß in der Basis der Blätter vom Vergilbungstyp V stärker in ihrer Entwicklung gehemmte Plastiden zu finden sind als in der Spitze der Blätter vom Typ VI—VII. Die noch chlorophyllhaltigen Plastiden sind mit einer mittleren Größe von $3,1 \times 4,0 \mu$ sehr viel kleiner als normale Chloroplasten. Infolge der Einlagerung zahlreicher großer Stärkekörner sind sie vollkommen deformiert; eine Granastruktur ist nicht zu erkennen (Abb. 10).

Nach 48stündigem Aufenthalt im Dunkelraum ist diese Stärke weitgehend abgebaut, wenn auch der Abbau bei Eisenmangel im Vergleich mit sehr stärkereichen Kontrollen etwas gehemmt ist. Mit Jod-Jodkalium sind

Abb. 11. Stärkefreie Plastiden mit mehreren Grana unterschiedlicher Größe aus der Basis eines Blattes vom Vergilbungstyp V nach 48 Std. Dunkelkultur. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 12. Von Stärkekörnern deformiertes, schwach chlorophyllhaltiges Plastid; Schwammparenchym eines Blattes vom Vergilbungstyp X. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 13. Schwammparenchymzelle eines Blattes vom Vergilbungstyp X mit Kern und zahlreichen farblosen, schwach amöboiden Plastiden im Plasmawandbelag; in vielen Plastiden sind 3—8 Grana von unterschiedlicher Größe nachweisbar; im Zellsafttraum Calciumoxalat-Kristalle. Handzeichnung nach einem ungefärbten Vitalpräparat.

Abb. 14. Amöboide, chlorophyllfreie Plastiden mit 2—8 Grana aus dem Schwammparenchym von Blättern des Vergilbungstyps X. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 15—18. Stärkste Hemmungserscheinungen infolge Eisenmangels in Blättern vom Vergilbungstyp X:

Abb. 15. Ausschnitt aus dem Schwammparenchym; im Plasmawandbelag der Zellen zahlreiche kleine chlorophyllfreie Plastiden (Pfeile) mit nur einem Granum im schwach amöboiden Stroma. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

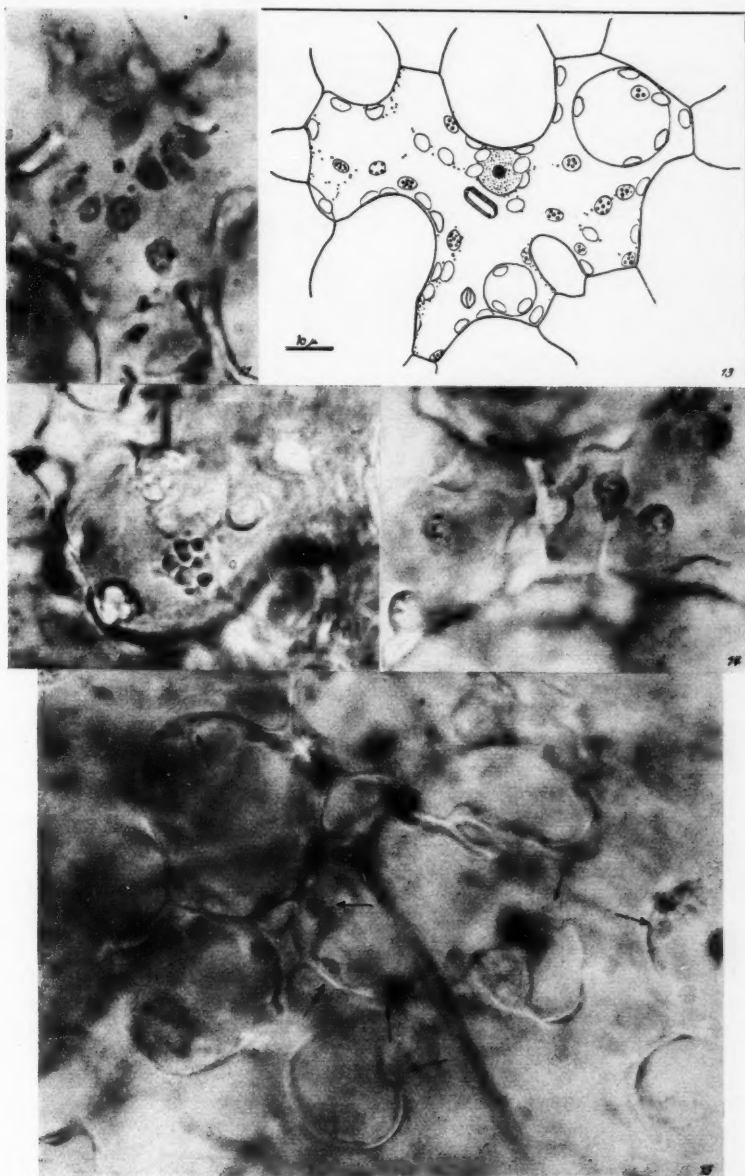


Abb. 11—15.

immer noch wenige kleine Stärkekörnchen im Stroma der chlorotischen Plastiden nachzuweisen. Eine Erklärung für diesen langsameren Abbau der nicht verbrauchten Reservestärke findet sich vermutlich in der verminderten Atmung, die nach *Burghardt* (1956) bei Eisenmangel auf 75% der Kontrollen sinkt. — Die von ihrer Stärke befreiten Plastiden sind schwach chlorophyllhaltig, stark amöboid, meist völlig homogen oder aber mit wenigen Grana unterschiedlicher Größe versehen (Abb. 11). Die Größe der Plastiden beträgt nach dem Stärkeabbau $3,0 \times 3,3 \mu$ gegenüber $5,1 \times 4,0 \mu$ vor Beginn der Dunkelkultur.

Ihren Höhepunkt erreicht die Eisenmangelchlorose nach etwa 5 bis 6 Wochen mit der Ausbildung vollkommen chlorotischer Blätter, wie sie für Blatttyp X beschrieben und abgebildet wurden. Bei der Untersuchung der Plastiden solcher Blätter läßt sich feststellen, daß in diesen äußerlich so einheitlich chlorotischen Geweben je nach ihrem Alter die unterschiedlichsten Differenzierungsgrade der Plastiden möglich sind. Alle diese Formen sind meist recht klein ($4,2 \times 1,9 \mu$) und besitzen, bei voll erhaltener Vitalität, hohe Amöboidie. Fluoreszenzoptische Kontrollen ergeben einen geringen Gehalt oder ein vollständiges Fehlen von Chlorophyll; meist sind die Plastiden farblos und so zart, daß es nicht leicht ist, sie mikrophotographisch abzubilden. Auf eine Färbung mit Rhodamin B wurde im allgemeinen verzichtet (s. S. 128).

Die Plastiden des Vergilbungstyps X sind im allgemeinen stärke- und chlorophyllfrei, optisch — im Vitalpräparat ebenso wie im Mikrotomschnitt nach der Anfärbung mit Eisenhämatoylin (S. 122) — vollkommen homogen und lassen keine Granastruktur erkennen. In seltenen Fällen enthalten sie Stärke (Abb. 12) oder aber — von dieser eindeutig zu unterscheiden — wenige Grana, die sich in vivo durch ihr hohes Lichtbrechungsvermögen und nach Fixation durch ihre elektive Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen auszeichnen (Abb. 13 und 14).

Einer totalen Hemmung der Plastidendifferenzierung unter dem Einfluß der Eisenmangelchlorose entsprechen die chlorotischen Plastiden der Abb. 15–18; sie finden sich in Zellen, die auf Grund ihrer lebhaften Plasmaströmung und des Aussehens ihrer Organelle als voll lebensfähig angesehen werden können. Die Plastiden scheinen ihre Entwicklung in einem sehr jugendlichen Zustand abgebrochen und nur eine geringfügige Substanzvermehrung erfahren zu haben; mit Längen von 2 bis 3μ sind sie die kleinsten überhaupt beobachteten chlorotischen Plastiden somatischer Zellen. In einem farblosen, amöboid formveränderlichen Stroma weisen sie ein oder seltener zwei Grana von hohem Lichtbrechungsvermögen auf (Abb. 15–17), die den Primärgrana der Monokotylen-Proplastiden auffallend ähneln (*Strugger* 1950, 1953, 1954 a, b; *Grave* 1954; *Böing* 1955; *Fasse-Franzisket* 1956). Ob es sich bei diesen chlorotischen Plastiden tatsächlich um direkte Proplastidenabkömmlinge handelt, die in ihrer ontogenetischen Entwicklung gehemmt wurden und nur eine Vermehrung ihrer plasmatischen Substanz erfuhren, kann nicht endgültig entschieden werden. Sie finden sich ausschließlich in den äußersten Blattbasen der jüngsten chlo-

rotischen Blätter unter der Knospe — in einem Gewebe also, das bei den Monokotylen besonders lange Zeit jugendlich bleibt und teilungs- und differenzierungsfähige Zellen behält.

Für diese Deutung spricht eine am lebenden Präparat beobachtete Granateilung, die in einem Plastid einer solchen Zelle im Verlauf einer Stunde vollzogen wurde (Abb. 18). Das fast kugelige Plastid bewegte sich unter ständiger Drehung langsam mit der Plasmaströmung durch die große, flache Schwammparenchymzelle. In der Seitenansicht fiel eine ringförmige Einschnürung des Granums auf (5'). Die beiden sich trennenden Grana waren zeitweilig in Schräglage zu sehen und boten ein Bild flacher dunkler Scheibchen (10', 13', 22'). Sie besaßen dann, wohl auf Grund ihrer Lage in verschiedenen optischen Ebenen, unterschiedliches Lichtbrechungsvermögen. Nach 50 Minuten war die Durchtrennung erfolgt, nach weiteren 60 Minuten lagen die beiden Grana in der Flächenansicht im Plastid nebeneinander.

Diese Vitalbeobachtungen stehen mit dem von Strugger (1950, 1953, 1954 b), Böing (1955) und Strugger und Kriger (1960) geschilderten Teilungsmodus der Primärgrana der Proplastiden sowie demjenigen der Grana ergrünender etiolierter Plastiden verschiedener Mono- und Dikotylen in Übereinstimmung. Sie geben, ebenso wie die Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen, einen Beleg für die Granastruktur der Einschlüsse chlorotischer Plastiden.

Die lichtmikroskopische Struktur der chlorotischen Plastiden sowie das Vorkommen von Granateilungen sprechen dafür, daß die Frage nach der Entstehung der chlorotischen Plastiden im Sinne einer primären Entwicklungshemmung als Folge des Eisenmangels zu beantworten ist. Ein Abbau ausdifferenzierter Jungchloroplasten oder Chloroplasten zu derart einfachen Formen ist kaum denkbar. Auch können bis zu diesem Stadium Schädigungen der Plastiden lichtmikroskopisch noch nicht festgestellt werden.

Wenn auch im lichtmikroskopischen Bereich eine Ähnlichkeit dieser chlorotischen Plastiden mit den Proplastiden der Monokotylen besteht, so darf jedoch nicht übersehen werden, daß neben der bei Eisenmangel eintretenden Entwicklungshemmung eine gewisse Substanzvermehrung — ähnlich wie bei etiolierten Plastiden (Strugger und Kriger 1960) — stattgefunden haben muß, durch die die Entwicklung der Plastiden u. U. in andere Bahnen gedrängt wird. Im sublichtmikroskopischen Bereich kann daher bei hochgradigem Eisenmangel mit anderen Feinstrukturen gerechnet werden. Dementsprechend sind Plastidenstadien mit kristallgitterartigen Primärgrana, wie sie von Heitz (1954), Leyon (1954 c) und Perner (1956 a) beschrieben wurden, im Verlauf der elektronenmikroskopischen Untersuchungen an chlorotischen Plastiden niemals gefunden worden. Andererseits ist zu berücksichtigen, daß diese maximal gehemmten chlorotischen Plastiden nur äußerst selten auftreten und daß überdies die Orientierungsmöglichkeiten am fixierten, eingebetteten Material sehr viel ungünstiger sind als bei Vitalbeobachtungen.

Nach sehr lange anhaltender Kultur in eisenfreier Nährlösung unterliegen die chlorotischen Plastiden der lipoiden und vakuoligen Degeneration

(Küster 1956). Entmischungen der Plastidenkomponenten und Ausbildung mehrerer Vakuolen von unterschiedlicher Größe stellen sich fast gleichzeitig mit Schädigungen der übrigen Zellorganelle und des Plasmas ein und führen schließlich zum Absterben der Zellen (Abb. 19 und 20).

Für diese Endstadien der Eisenmangelchlorose sind in noch lebenden Zellen mit strömendem Plasma die folgenden charakteristischen Eigenschaften festzustellen:

1. das Fehlen von Chlorophyll;
2. Amöboidie und bizarre Form der geschädigten Plastiden;
3. das Vorkommen zahlreicher großer und kleiner Vakuolen, die die Stromasubstanz zerreißen und unförmig auftreiben;
4. das Auftreten schwarzer, stark lichtbrechender Einschlüsse von unterschiedlicher Größe, die in Dimension und Lage keine Gesetzmäßigkeiten aufweisen und keine direkten Beziehungen zu den Grana der Plastiden herzustellen erlauben; sie müssen als Artefakte aufgefaßt werden.

In mechanisch geschädigten Zellen — zum Beispiel am Schnitttrand — findet man an Stelle der beschriebenen vitalen oder degenerierenden Plastiden des übrigen ungeschädigten Gewebes kleine kugelige Bläschen ohne jede Innenstruktur (Abb. 21). Die Abkuglung ehemals amöboider chlorotischer Plastiden kann in solchen Zellen oftmals unmittelbar verfolgt werden. Mit der Einwirkung von Eisenmangel haben diese Degenerationsformen also nichts zu tun.

Auf die hochgradige Empfindlichkeit von Proplastiden gegenüber mechanischen Schädigungen und Änderungen der äußeren Bedingungen weist u. a. Fasse-Franzisket (1956, S. 202) hin. So könnte auch in der leicht eintretenden Abkuglung der chlorotischen Plastiden ein Hinweis auf ihre relativ jugendliche Natur gegeben sein.

Abb. 16. Farblose, schwach amöboide Plastiden mit 1—2 Grana; Schwammparenchym, Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 17. Schwammparenchymzelle eines Blattes vom Vergilbungstyp X mit chlorophyllfreien, schwach amöboiden unigranulären Plastiden; in wenigen Plastiden 2—3 Grana. Handzeichnung nach einem ungefärbten Vitalpräparat.

Abb. 18. Stadien der Granateilung nach 5, 10, 15, 22, 50 und 110 Minuten in einem chlorotischen Plastid wie in Abb. 17. Handzeichnung nach einem lebenden, ungefärbten Präparat.

Abb. 19 und 20. Zunehmende Degeneration chlorotischer Plastiden als Folge lange andauernder Kultur in eisenfreier Nährlösung:

Abb. 19 und 19a. Degenerierende chlorotische Plastiden mit bizarren Umrissen, großen und kleinen Vakuolen und dunklen Einschlüssen von ungleichmäßiger Lage und Größe. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 20. Vakuolig degenerierte Plastiden und grob strukturierter Kern als Zeichen für eine weitgehend irreversible Schädigung infolge lange anhaltenden Eisenmangels (vgl. Lamprecht 1960 b, Abb. 18—20). Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 21. Abkuglung chlorotischer Plastiden als Folge mechanischer Schädigung der Zellen. Näheres im Text. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

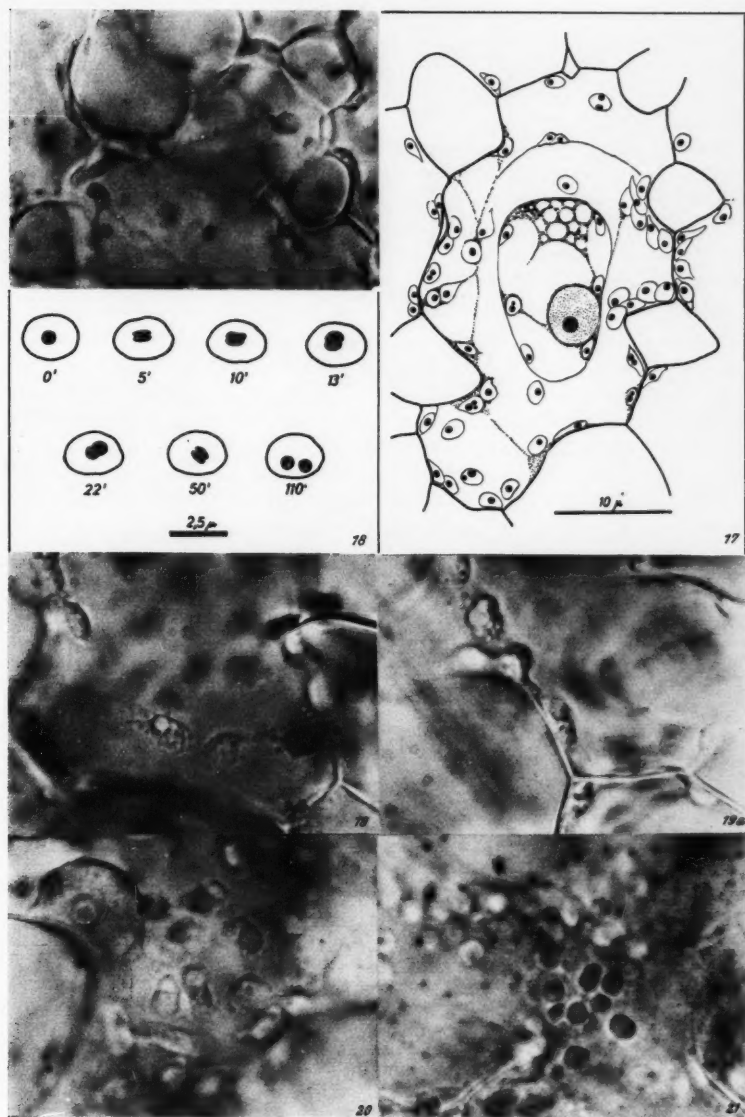


Abb. 16–21.

3. Die sekundäre Ergrünung chlorotischer Plastiden

Eine Ergrünung der chlorotischen Plastiden, wie sie schon Zimmermann (1893) beschreibt, ist nur möglich, solange das Differenzierungsvermögen der Plastiden ungestört erhalten ist. Diese Voraussetzung ist bei den geschilderten Degenerationsformen irreversibel entmischter und vakuolisierter Plastiden nicht mehr gegeben, wohl aber bei den vitalen, proplastidenähnlichen, stark amöboiden Plastiden, wie sie z. B. an Hand der Abb. 14 und 15 beschrieben wurden. Es ist jedoch außerordentlich schwierig, die Grenze zwischen ergrünungsfähigen, nur in ihrer Entwicklung gehemmten Plastiden einerseits und irreversibel geschädigten chlorotischen Plastiden andererseits zu ziehen; auf Grund mikroskopischer Befunde allein ist diese Unterscheidung nicht möglich.

Daß sich bei der bereits beschriebenen sekundären Ergrünung (S. 125) tatsächlich chlorotische Plastiden zu assimilierenden grünen Chloroplasten entwickeln, belegt Abb. 22. In der sehr schmalen kritischen Zone zwischen noch chlorotischem apikalen und schon ergrünem basalen Blattgewebe finden sich diese Stadien im Abstand von wenigen Zellen dicht beieinander: amöboide, sehr schwach chlorophyllhaltige Plastiden mit 3—4 Grana (Abb. 22 a); formstabilere, chlorophyllhaltige, stärkefreie Plastiden mit 8—10 Grana (Abb. 22 b); schließlich völlig ergrünte junge Chloroplasten, die dicht mit großen Stärkeschollen bepackt sind (Abb. 22 c).

Systematische Ergrünungsversuche wurden nicht durchgeführt.

4. Die Plastiden der Epidermis und der Schließzellen

Die Leukoplasten der Epidermiszellen von *Tradescantia albiflora* sind bereits von Zimmermann (1893, S. 3) eingehend untersucht worden. Ihre auffallend großen, stark lichtbrechenden Grana bezeichnet Zimmermann als Leukosomen. Kaja wies 1956 an den prinzipiell gleich gebauten Leukoplasten von *Chlorophytum comosum* nach, daß sich die Grana durch aufeinanderfolgende Teilungen aus einem Primärgranum bilden.

In ungeschädigten Epidermiszellen sind die Leukoplasten in vivo oft sehr gut zu erkennen, vor allem, wenn sie mit der Plasmaströmung im Wandbelag der Außenperiklinen durch die Zelle transportiert werden (Abb. 23).

Es ist bemerkenswert, daß die Struktur der Leukoplasten auch bei hochgradigem Eisenmangel vollkommen normal erhalten bleibt. Diese nicht assimilierenden, im Vergleich zu Chloroplasten einfach organisierten Plastidentypen werden also durch Eisenmangel nicht sichtbar beeinflusst.

Die Schließzellen nehmen nicht nur im Gesamtverband der Epidermis, sondern im ganzen Blatt eine Sonderstellung ein (Weber 1926). Die oft sehr stärkereichen Chloroplasten der Stomata bleiben auch bei Eisenmangel viel länger funktionsfähig als die Plastiden der Mesophyllzellen und bewahren ihre normale Chloroplastenstruktur. Erst wenn sich in den Mesophyllzellen schon weitgehend irreversibel geschädigte Plastiden zeigen,

sind die Chloroplasten der Schließzellen kleiner als in Kontrollen; jedoch besitzen sie noch immer Chlorophyll und mehrere Grana, meist auch 2–3 Stärkekörner.

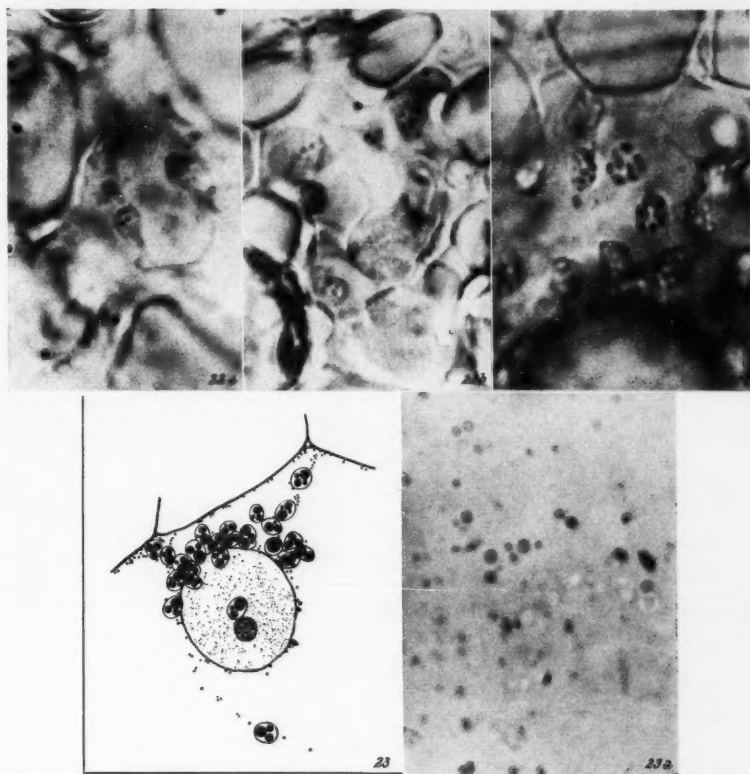


Abb. 22 a, b, c. Sekundär ergrünende chlorotische Plastiden aus der kritischen Zone eines ergrünenden, ehemals chlorotischen Blattes vom Typ X. Näheres im Text. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.

Abb. 23 und 23 a. Leukoplasten aus Epidermiszellen chlorotischer Blätter vom Vergilbungstyp X. Die Struktur der Leukoplasten — ein bis vier große, stark lichtbrechende, chlorophyllfreie Grana in farblosem Stroma — bleibt auch bei hochgradigem Eisenmangel erhalten. (Abb. 23. Handzeichnung nach einem ungefärbten Vitalpräparat. Abb. 23 a. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.)

Ähnliche Beobachtungen machten Küster (1956, S. 391) und Kenda, Thaler und Weber (1953) an vergilbten Blättern; bei einer Reihe verschiedener Pflanzen war beim Vergilbungsprozeß in den Schließzellen die Umwandlung der Chloroplasten in Chromoplasten nicht erfolgt.

5. Messungen zum Vergleich der Größenverhältnisse normaler und chlorotischer Plastiden

In den besprochenen lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde eine zunehmende Hemmung der Plastidenentwicklung bei anhaltender Eisenmangelwirkung festgestellt. Um diese Befunde auch quantitativ zu sichern, wurden vergleichende Messungen an chlorotischen Plastiden der verschiedensten Stadien und an Chloroplasten aus Blättern von Kontrollpflanzen vorgenommen.

Die Messungen wurden ausschließlich an eindeutig vitalen Zellen durchgeführt. In Handschnitten von Blattpartien möglichst einheitlichen Chlorose-

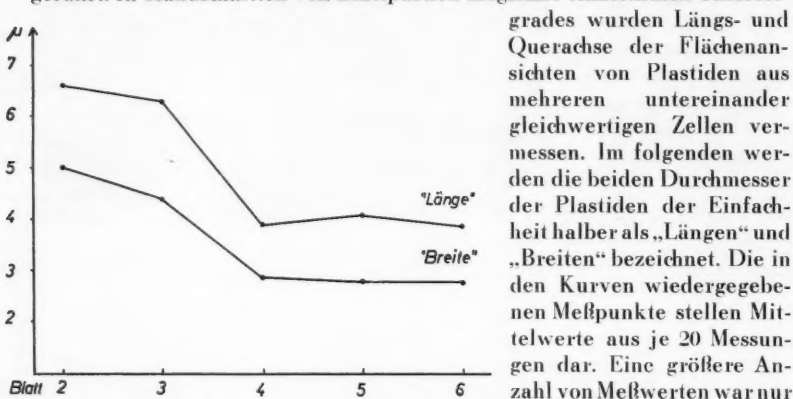


Fig. 1. Die Größenabnahme der Plastiden bei zunehmender Einwirkung von Eisenmangel (vgl. Tab. 2).

grades wurden Längs- und Querachse der Flächenansichten von Plastiden aus mehreren untereinander gleichwertigen Zellen vermessen. Im folgenden werden die beiden Durchmesser der Plastiden der Einfachheit halber als „Längen“ und „Breiten“ bezeichnet. Die in den Kurven wiedergegebenen Meßpunkte stellen Mittelwerte aus je 20 Messungen dar. Eine größere Anzahl von Meßwerten war nur in einigen Fällen zu erhalten, da in den begrenzten Gewebestücken nur wenige Plastiden in einer für Messungen idealen Lage anzutreffen waren; Messungen mit 50 Einzelwerten ergaben außerdem keine prinzipiell unterschiedlichen Verteilungskurven.

Tabelle 2.

— Fe, Kultur vom 20. 12. 1956 (56–60 Tage alt)					
Blatt Nr.	2	3	4	5	6
Gesamtlänge des Blattes in Millimetern	30	42	41	38	32
Typ	III-IV	V	X	X	X
Schnitt, Millimeter von der Basis . .	—	5–8	6–9	4–9	5–7
„Länge“ in μ	6,6	6,3	3,9	4,1	3,9
„Breite“ in μ	5,0	4,4	2,9	2,8	2,8

Der makroskopisch und lichtmikroskopisch festgestellte Gradient der zunehmenden Vergilbung von den älteren zu den jüngeren Blättern einerseits

und von der Spitze der einzelnen Blätter zur Basis andererseits kommt auch in den nachstehenden Meßkurven zum Ausdruck.

In Fig. 1 sind die Längen und Breiten von Plastiden aus dem Schwammparenchym der Basis von 5 aufeinanderfolgenden Blättern bei zunehmender Chlorose wiedergegeben. Die Daten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Der Zweig besaß sechs voll entfaltete Blätter, von denen Blatt 2 dem Vergleichstext III—IV entsprechend die ersten Chlorosesymptome zeigte. Die Plastiden waren $6,6 \times 5,0 \mu$ groß, grün und besaßen zahlreiche Grana und einzelne Stärkekörner.

Das dem Typ V entsprechende 3. Blatt wies ähnliche, lebhaft grüne, wenig kleinere Plastiden auf ($6,3 \times 4,4 \mu$), in denen Grana noch immer deutlich nachweisbar waren, Stärke jedoch fehlte.

Das 4. Blatt entsprach mit gleichmäßig zartgelber Färbung dem Blatttyp X. Seine Plastiden waren mit einer mittleren Größe von $5,9 \times 2,9 \mu$ sehr viel kleiner als die der älteren Blätter, von hellem Grün und oft amöboid ausgezogen. Grana waren nur vereinzelt sehr undeutlich zu erkennen; der Stärkenachweis blieb negativ.

Das 5. Blatt (Typ X) war noch stärker chlorotisch als das vorangegangene und völlig farblos. Die stärkefreien, zartgrünen Plastiden besaßen wenige Grana in unterschiedlichen Größen. Die erhöhte Amöboidie dieser Plastiden kommt in dem größeren Mittelwert für die Längen zum Ausdruck ($4,1 \times 2,8 \mu$).

Das jüngste Blatt (6), das sich gerade aus der Knospe entfaltet hatte, war ebenfalls farblos und nur an der Spitze zartgrün getönt (Typ X). Die farblosen, stärkefreien Plastiden besaßen 1—3 Grana. Auch hier fanden sich oft amöboide Stromafortsätze ($3,9 \times 2,8 \mu$).

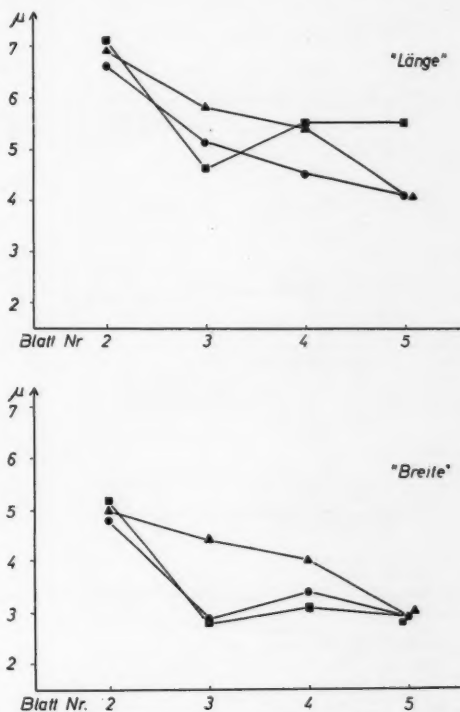


Fig. 2. Die Größenabnahme der Plastiden bei zunehmender Einwirkung von Eisenmangel, gemessen im Schwammparenchym der Blattspitze, -mitte und -basis von vier aufeinanderfolgenden Blättern (vgl. Tab. 3).

Die Fig. 2 bringt eine prinzipiell ähnliche Darstellung (vgl. Tab. 5). Die Plastiden aus dem Schwammparenchym von vier aufeinanderfolgenden Blät-

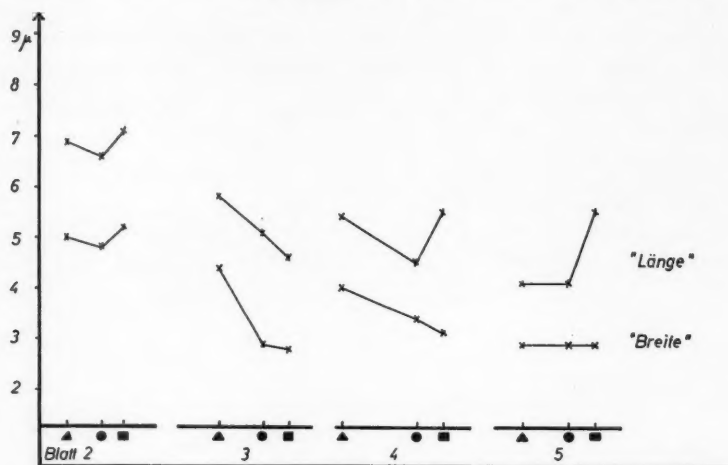


Fig. 3. Der Chlorosegradient in vier aufeinanderfolgenden Blättern einer Eisenmangelpflanze, dargestellt an den Größen der Plastiden des Schwammparenchyms der Blattspitze, -mitte und -basis. Die Daten sind der Tab. 3 zu entnehmen. Näheres im Text.

tern wurden hier sowohl an der Blattbasis als auch in der Blattmitte und nahe der Spitze gemessen. Längen und Breiten sind getrennt gezeichnet. Innerhalb

Tabelle 3.

— Fe, Kultur vom 28. 2. 1957 (48 Tage alt)					
Blatt Nr.		2	3	4	5
Gesamtlänge des Blattes		31	36	36	34
Typ		V	VI—VII	X	X
SPITZE ▲	Schnitt (mm von der Basis)	22—25	25—28	33—35	26—27
	„Länge“ in μ	6,9	5,8	5,4	4,1
	„Breite“ in μ	5,0	4,4	4,0	2,9
MITTE ●	Schnitt (mm von der Basis)	13—16	12—14	13—15	12—16
	„Länge“ in μ	6,6	5,1	4,5	4,1
	„Breite“ in μ	4,8	2,9	3,4	2,9
BASIS ■	Schnitt (mm von der Basis)	7—10	5—7	6—8	6—8
	„Länge“ in μ	7,1	4,6	5,5	5,5
	„Breite“ in μ	5,2	2,8	3,1	2,9

eines Blattes sind — dem Chlorosegradienten entsprechend — die Plastiden der Blattspitze am größten, die der Basis — als der am stärksten chlorotischen Blattzone — am kleinsten. Eine Ausnahme machen die Plastiden der jüngsten chlorotischen Blätter; hier sind die Längen der Plastiden aus der Basis größer als diejenigen aus der Blattmitte und der Blattspitze: die Plastiden dieser Gewebe sind — im Gegensatz zu allen anderen — stark amöboid. Die sich überschneidenden Werte für die Längen und Breiten der Plastiden des 2. Blattes liegen innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite.

Der Chlorosegradient innerhalb der einzelnen Blätter kommt in Fig. 3 klarer zum Ausdruck. Die Längen und Breiten der Plastiden wurden für die einzelnen Blätter getrennt und in Abhängigkeit von der Lage der Schnitte auf der Blattspitze dargestellt. Auf der Abszisse ist die Gesamtlänge der untersuchten Blätter abgetragen. Die Blattspitze ist links zu denken, die Basis rechts. Im Abstand der Schnittstelle von der Blattbasis sind die Längen und Breiten der Plastiden der drei untersuchten Blattzonen auf der Ordinate abgetragen. Blatt 2 zeigt nur zufällige Unterschiede zwischen den Plastiden der drei Blattzonen, Blatt 3 eine deutliche Größenabnahme der Plastiden von der Spitze zur Basis. In den Blättern 4 und 5 macht sich die erhöhte Amöboidie der Plastiden der Blattbasis in einem sprunghaften Ansteigen der Längen bei sehr kleinen Werten für die Breiten bemerkbar. — Die Daten entsprechen denen der Fig. 2 (vgl. Tab. 3).

Vergleichende Messungen an Kontrollen wurden an fünf aufeinanderfolgenden voll entfalten Blättern im Schwammparenchym der Basis, Mitte und Spitze eines jeden Blattes vorgenommen (Fig. 4, Tab. 4). Die Plastiden-

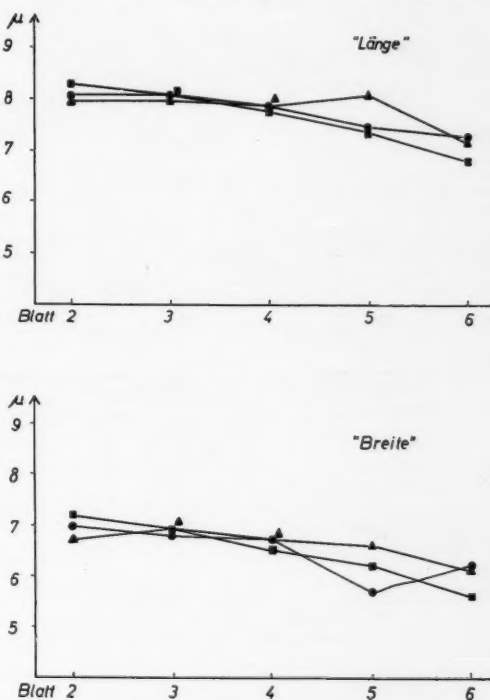


Fig. 4. Die Größe der Chloroplasten von Kontrollpflanzen, gemessen im Schwammparenchym der Blattspitze, -mitte und -basis von fünf aufeinanderfolgenden Blättern (vgl. Tab. 4).

größen liegen in allen drei Zonen fast immer sehr eng beisammen und vermindern sich für die Längen ebenso wie für die Breiten von den älteren zu den jüngeren Blättern nur um rund 1μ . In den jüngsten Blättern sind die

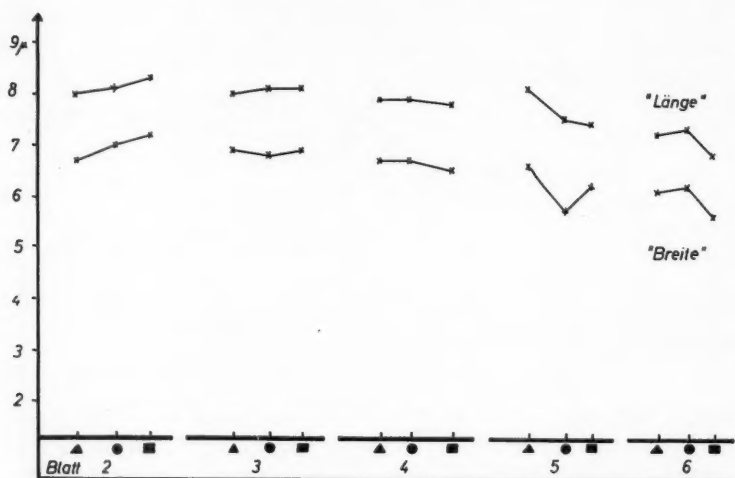


Fig. 5. Die Größe der Chloroplasten in fünf aufeinanderfolgenden Blättern einer Kontrollpflanze. Die Daten sind der Tab. 4 zu entnehmen. Näheres im Text.

Plastiden noch nicht zu ihrer endgültigen Größe herangewachsen. Die weitere Größenzunahme ist allerdings nur noch gering.

Tabelle 4.

Kontrolle						
Blatt Nr.		2	3	4	5	6
Gesamtlänge des Blattes		53	55	54	50	42
Typ		I	I	I	I	I
SPITZE ▲	Schnitt (mm von der Basis)	37—39	35—37	36—38	33—34	29—31
	„Länge“ in μ	8,0	8,0	7,9	8,1	7,2
	„Breite“ in μ	6,7	6,9	6,7	6,6	6,1
MITTE ●	Schnitt (mm von der Basis)	21—23	20—23	24—26	18—20	17—19
	„Länge“ in μ	8,1	8,1	7,9	7,5	7,3
	„Breite“ in μ	7,0	6,8	6,7	5,7	6,2
BASIS ■	Schnitt (mm von der Basis)	8—10	7—10	7—9	7—10	7—9
	„Länge“ in μ	8,3	8,1	7,8	7,4	6,8
	„Breite“ in μ	7,2	6,9	6,5	6,2	5,6

Bei einer Auftrennung der Meßwerte für die einzelnen Blätter entsprechend der Fig. 3 zeigt sich nur in den jüngsten Blättern (5, 6) eine Größenabnahme der Plastiden von der Spitze zur Basis (Fig. 5, Tab. 4). Die basalen Zonen der Monokotylenblätter bleiben besonders lange wachstums-, teilungs- und differenzierungsfähig.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Stecklinge von *Tradescantia albiflora* (Kth.) wurden in Wasserkultur eisenfrei aufgezogen. Kontrollen erhielten 10 mg Fe/l Nährlösung in Form des EDTA-Chelats. Die vor Kulturbeginn vorhandenen Blätter behalten ihre dunkelgrüne Färbung bis zum Absterben bei. Während der weiteren Entwicklung der Pflanze macht sich der Eisenmangel an einer fortschreitenden Aufhellung der neugebildeten Blätter bemerkbar, die zunächst die Intercostalfelder, dann von der Basis aus allmählich das ganze Blatt erfaßt. Die jüngsten chlorotischen Blätter erreichen kaum die halbe Länge der Blätter von Kontrollpflanzen und sind schneeweiß.

2. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigte sich, daß nicht allein der Chlorophyllmangel diese Symptome bedingt. Der fortschreitenden Vergilbung der Blätter entspricht eine Reduktion der Plastiden: Größe, Differenzierungsgrad und Formstabilität gehen bei anhaltendem Eisenmangel immer mehr zurück; jedes einzelne Plastid behält seinen einmal erreichten Differenzierungsgrad jedoch bis zum Absterben des Blattes bei.

3. Nach lange anhaltender Kultur in eisenfreier Nährlösung treten an den chlorotischen Plastiden Degenerationserscheinungen auf, die von mechanischen Schädigungen einwandfrei unterschieden werden können.

Literatur

- Bartels, F., 1955: Cytologische Studien an Leukoplasten unterirdischer Pflanzenorgane. *Planta* 45, 426.
- Baumeister, W., 1958: Die Hauptnährstoffe. In: Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiol., Band IV, 482. Springer 1958.
- Bear, F. E., 1949: Hunger signs in crops. A symposium. The Amer. Soc. of Agronomy and the Nation. Fertilizer Assoc., Washington 1949.
- Böing, J., 1955: Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Chloroplasten von *Helodea densa*. *Protoplasma* 45, 55.
- Brown, J. C., and S. B. Hendricks, 1952: Enzymatic activities as indications of copper and iron deficiencies in plants. *Plant Physiol.* 27, 651.
- Burghardt, H., 1956: Beiträge zum Eisen-Mangan-Antagonismus der Pflanzen. *Flora* 145, 1.
- Buvat, R., 1958: Recherches sur les infrastructures du cytoplasme, dans les cellules du méristème apical, des ébauches foliaires et des feuilles développées d'*Elodea canadensis*. *Ann. Sci. Natur. Bot., Sér. XI*, 19, 121.
- Cohen, M., and E. Bowler, 1953: Lamellar structure of the tobacco chloroplast. *Protoplasma* 42, 414.
- DeKock, P. C., 1956: Heavy metal toxicity and iron chlorosis. *Ann. Bot., N. S.* 20, 135.

- De Kock, P. C., and R. I. Morrison, 1958 a: The metabolism of chlorotic leaves. I. Amino acids. *Biochem. J.* 70, 266.
- — 1958 b: The metabolism of chlorotic leaves. II. Organic acids. *Biochem. J.* 70, 272.
- Erkama, J., 1950: On the effect of copper and manganese on the iron status of higher plants. In: Wallace-Lotsya: Trace elements in plant physiology, S. 53, Waltham, Mass. USA.
- Fasse-Franzisket, U., 1956: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus* l'Herit. *Protoplasma* 45, 194.
- Frey-Wyssling, A., und K. Mühlethaler, 1949: Über den Feinbau der Chlorophyllkörner. *Vjschr. Naturforsch. Ges. Zürich*, 94, 179.
- und E. Steinmann, 1953: Ergebnisse der Feinbauanalyse der Chloroplasten. *Vjschr. Naturforsch. Ges. Zürich*, 98, 20.
- F. Ruch und X. Berger, 1956: Monotrope Plastidenmetamorphose. *Protoplasma* 45, 97.
- Grave, G., 1954: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*. *Protoplasma* 44, 275.
- Griessmeyer H., 1950: Über experimentelle Beeinflussung des Eisens im Chloroplasten. *Planta* 11, 531.
- Gris, A., 1857: Recherches microscopiques sur la chlorophylle. *Ann. Sci. Natur. Bot.*, Sér. IV, 7, 179.
- Gris, E., 1845: De l'action des composés ferrugineux sur la végétation. *C. r. Acad. Sci.*, Paris 19, 18, 1844. *Zit. nach Schropp* 1951, S. 180.
- Haber, W., 1959: Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung der Chloroplasten von *Cabomba furcata* Schult. f. *Protoplasma* 50, 269.
- Heitz, E., 1956: Gerichtete Chlorophyllscheiben als strukturelle Assimilationseinheiten der Chloroplasten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 54, 562.
- 1957: Über den Bau der Plastiden. 1. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. *Planta* 26, 154.
- 1954: Kristallgitterstruktur des Granums junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. *Exper. Cell Res.* 7, 606.
- Hodge, A. J., J. D. McLean, and F. V. Mercer, 1955: Ultrastructure of the lamellae and grana in the chloroplasts of *Zea Mays* L. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 1, 605.
- Holley, R. W., and J. D. Cain, 1955: Accumulation of arginine in plants, afflicted with iron-deficiency. *Science* 121, 172.
- Jacobson, L., 1951: Maintenance of iron supply in nutrient solution by a single addition of ferric-potassium-ethylene-diamine-tetra-acetate (EDTA). *Plant Physiol.* 26, 411.
- Kaja, H., 1954 a: Untersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Plastiden der Moose. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 67, 95.
- 1954 b: Untersuchungen über die Chromatophoren und Pyrenoide der *Anthocerotales*. *Protoplasma* 44, 156.
- 1956: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Leukoplasten in der Epidermis von *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Bak. *Protoplasma* 47, 280.
- 1957: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Chromatophoren von *Anthoceros laevis* L. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 70, 545.

- Kenda, G., I. Thaler und F. Weber, 1953: Schließzellenchloroplasten vergilben nicht. *Protoplasma* 42, 246.
- Kruger, L., 1957: Cytologische Untersuchungen an etiolierten Plastiden. Dissertation Münster.
- Küster, E., 1956: Die Pflanzenzelle. Die Plastiden: S. 334, Jena 1956, 3. Auflage.
- Lamprecht, I., 1961b: Die Feinstruktur der Plastiden von *Tradescantia albiflora* (Kth.) bei Eisenmangelchlorose. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Protoplasma* 53.
- Leyon, H., 1954a: The structure of chloroplasts III. *Exper. Cell Res.* 6, 497.
- 1954b: The structure of chloroplasts IV. The development and structure of the *Aspidistra* chloroplast. *Exper. Cell Res.* 7, 265.
- 1954c: The structure of chloroplasts VI. The origine of the chloroplast laminae. *Exper. Cell Res.* 7, 609.
- Liebich, H., 1941: Quantitativ-chemische Untersuchungen über das Eisen in den Chloroplasten und übrigen Zellbestandteilen von *Spinacea oleracea*. *Z. Bot.* 37, 129.
- Maier-Geisenheim, W., 1942: Was wissen wir heute von der Chlorose? *Forschungsdienst* 13, 149.
- McGeorge, W. T., 1949: Lime-induced chlorosis: Relation between active iron and citric and oxalic acids. *Soil Science* 68, 381.
- Menke, W., 1940: Die Lamellarstruktur der Chloroplasten im ultravioletten Licht. *Naturwiss.* 28, 158.
- 1959: Zur Entwicklungsgeschichte der Plastiden von *Oenothera Hookeri* und Morphogenese der Chloroplastenstruktur (2. Mitteilung zur Entwicklungsgeschichte der Plastiden). *Z. Naturf.* 14b, 394.
- Meyer, A., 1883: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig, Arthur Felix.
- 1918: Eiweißstoffwechsel und Vergilben der Laubblätter von *Tropaeolum majus*. *Flora* 111, 85.
- Molisch, H., 1892: Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. Jena, Fischer-Verlag.
- Mudrack, K., 1956: Experimentelle Untersuchungen an isolierten Chloroplasten. *Protoplasma* 46, 556.
- Mühlethaler, K., 1956: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden. *Protoplasma* 45, 264.
- Nason, A., H. A. Oldewurtel, and L. M. Probst, 1952: Role of micro-nutrient elements in the metabolism of higher plants. I. Changes in oxidative enzyme constitution of tomato leaves deficient in micronutrient elements. *Arch. Biochem.* 38, 1.
- Perner, E. S., 1954: Zum mikroskopischen Nachweis des primären Granums in den Leukoplasten. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 67, 26.
- 1956a: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. I. Die Persistenz des Primärgranums und seine fragliche Kristallgitterstruktur im Proplastid. *Z. Naturf.* 11b, 560.
- 1956b: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. II. Das Verhalten der Proplastiden bei der Entwicklung zu Jungchloroplasten. *Z. Naturf.* 11b, 567.

- Pirson, A., 1958: Mineralstoffe und Photosynthese. In: Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiol., Band IV, 355. Springer 1958.
- Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik. München, 1948, Leibniz-Verlag.
- Sager, R., and G. E. Palade, 1954: Chloroplast structure in green and yellow strains of *Chlamydomonas*. *Exper. Cell Res.* 7, 584.
- 1957: Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 3/1, 465.
- Schimper, A. F. W., 1883: Über die Entstehung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. *Bot. Z.* 41, 105.
- 1885: Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. *J. wiss. Bot.* 16, 1.
- Schropp, W., 1954: Die Eisenversorgung der Pflanzen bei Wasserkulturversuchen. *Z. Pflanzenernährg., Düng. u. Bodenkde.* A 33, 38.
- 1951: Der Vegetationsversuch. I. Die Methodik der Wasserkultur höherer Pflanzen. Verlag Neumann, Radebeul und Berlin.
- Shive, J. W., 1915: A three-salt nutrient solution for plants. *Amer. J. Bot.* 2, 157.
- Sitte, P. 1958: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse. Eine elektronenmikroskopische Studie. *Protoplasma* 49, 447.
- Spiekermann, R., 1957: Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Nucleinsäuren in Proplastiden. *Protoplasma* 48, 305.
- Steinmann, E., and F. S. Sjöstrand, 1955: The ultrastructure of chloroplasts. *Exper. Cell Res.* 8, 15.
- Strugger, S., 1957: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. *Flora* 151, 324.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Springer, Heidelberg 1949, 2. Auflage.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten (Vorläufige Mitteilung). *Naturwiss.* 37, 166.
- 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 64, 69.
- 1953: Über die Struktur der Proplastiden. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 439.
- 1954 a: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des primären Granums in den Proplastiden. *Naturwiss.* 41, 286.
- 1954 b: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus*. *Protoplasma* 43, 120.
- 1956 a: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 69, 177.
- 1957 a: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Proplastiden des Vegetationskegels von *Elodea densa*. *Protoplasma* 48, 360.
- 1957 b: Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Teilung der Proplastiden im Urmeristem der Wurzelspitze von *Allium cepa*. *Z. Naturf.* 12 b, 280.
- und E. S. Perner, 1956: Beobachtungen zur Frage der ontogenetischen Entwicklung des somatischen Chloroplasten. *Protoplasma* 46, 711.
- und M. Losada-Villasante, 1956: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von *Chlorophytum comosum*. *Protoplasma* 45, 540.
- und L. Kriger, 1960: Untersuchungen über die Struktur der Plastiden etiolierter Pflanzen. *Protoplasma* 52, 230.

- Stubbe, W., und D. v. Wettstein, 1956: Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von *Oenothera*. *Protoplasma* **45**, 241.
- Wallace, T., 1944: The diagnosis of mineral deficiencies in plants. A colour atlas and guide. His Majesty's Stationary Office, London 1945, Supplement 1944.
- Weber, F., 1926: Die Schließzellen (Sammelreferat). *Arch. exper. Zellforsch.* **3**, 101.
- Weinstein, L. H., and W. R. Robbins, 1955: The effect of different iron and manganese nutrient levels on the catalase and cytochrome oxydase activities of green and albino sunflower leaf tissues. *Plant Physiol.* **50**, 27.
- Wettstein, D. v., 1957 a: Chlorophyll-Letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Exper. Cell Res.* **12**, 427.
- 1957 b: Genetics and the submicroscopic cytology of plastids. *Hereditas* **43**, 305.
- Zimmermann, A., 1893: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle. S. 3: Zur Kenntnis der Leukoplasten; S. 26: Über die Chromatophoren in chlorotischen Blättern.

Anschrift des Verfassers: Dr. Ingrid Lamprecht, Köln-Vogelsang, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung.

Referat

Swanson, C. P.: Cytologie und Cyto-genetik. Aus dem Amerikanischen übersetzt von G. Röbbelen. Mit 221 Abb., XIV, 525 S. Stuttgart: Gustav Fischer, 1960. DM 96.—.

Die Cytologie hat nicht nur eine seit der Entdeckung der Zelle bis heute anhaltende, ja sogar sich steigernde Dynamik entfaltet, sie ist wie kaum ein anderes Wissensgebiet mit immer mehr Nachbardisziplinen innigst verknüpft. Die ältesten Berührungspunkte sind die Embryologie und später die Genetik; in neuester Zeit hat die Biophysik und der zur Cytochemie ausgebaute Zweig der Biochemie dieser Wissenschaft einen neuen, außerordentlich starken Auftrieb verliehen, wobei allmählich auch die Grenzen zur Zellphysiologie zu verschwimmen beginnen. Es muß daher als ein Wagnis erscheinen, ein so weitreichendes und nicht einmal scharf abzugrenzendes Wissensgebiet übersichtlich darzustellen. Es sei vorweggenommen, das Wagnis, dem sich Swanson, Professor der Biologie an der John Hopkins-Universität, Baltimore, unterzogen hat, erscheint vollkommen geglückt. Ein Blick auf das Inhaltsverzeichnis schon zeigt die gebotene Stofffülle und die Spannweite der hier behandelten Probleme. Nach einer historischen Einleitung werden kurz die Geräte und Methoden der modernen Zytologie gestreift. Ein Überblick über den Bau der Zelle, die Zellteilung, Befruchtung und Fortpflanzung bei Pflanze und Tier und die Chromosomentheorie der Vererbung bildet die Grundlage der Darstellung. Die folgenden Abschnitte behandeln die Struktur der Chromosomen und ihre qualitativen und quantitativen Änderungen, ihre Bewegungen, den Austausch und die Chiasmen, Veränderungen im chromosomalen Verhalten (Chimären, Endomitose, Chromosomenreduktion und -diminution, Aberrationen usw.) sowie die Struktur und Wirkungsweise der Gene. Die Bakterien und Viren werden entsprechend ihrer Schlüsselstellung in der modernen Cyto-genetik gebührend berücksichtigt. Die letzten Kapitel befassen sich mit der Evolution der cytologischen Systeme. Seinen besonderen Wert erhält das Buch nicht allein dadurch, daß die immense Literatur vor allem des letzten Jahrzehnts verarbeitet ist (sie wird bis 1957 berücksichtigt), sondern auch dadurch, daß stets Gesichertes und noch Problematisches auseinandergehalten wird. Manchmal überrascht, daß gegenüber Fakten, die man als bereits gesichert anzunehmen gewohnt ist, noch eine gewisse Zurückhaltung geübt wird. Hervorzuheben ist auch die treffliche und überaus reiche Bebilderung. Swansons Werk gibt somit eine zuverlässige, umfassende und kritische Übersicht des derzeitigen Standes der Cyto-genetik und Ref. glaubt mit seiner Meinung nicht zu übertreiben, daß damit ein Standardwerk geschaffen worden ist. Es ist daher besonders zu begrüßen, daß es dank der ausgezeichneten Übersetzung Röbbelens nun auch den Interessenten im deutschen Sprachraum ohne Schwierigkeiten zugänglich ist und hier eine empfindliche Lücke bestens ausfüllt. Die deutsche Ausgabe ist, wie der Übersetzer angibt, gegenüber dem Original nur geringfügig erweitert, einige Abbildungen wurden neu gezeichnet und das Literaturverzeichnis ergänzt. Die überaus zahlreichen Literaturhinweise erleichtern das weitere Eindringen in jedes der behandelten Teilgebiete.

O. Härtel (Graz).

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Karl Höfler, Universität Wien, Prof. Dr. E. Perner, Tierärztliche Hochschule, Hannover und Doz. Dr. K. E. Wohlfarth-Botzermann, Universität Bonn — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlgasse 19-21

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Lamprecht, Ingrid: Die Feinstruktur der Plastiden von <i>Tradescantia albiflora</i> (Kth.) bei Eisenmangelchlorose (II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen)	3. 4. 1960
Thaler, Irmtraud: Virus-Einschlüsse in <i>Fritillaria Meleagris</i> L.	24. 4. 1960
Pavlečić, Z., und H. Lieth: Die Entwicklung von <i>Lophocolea</i> -Arten nach einer kurzzeitigen Plasmolysebehandlung	28. 4. 1960
Biebl, R., W. Uri und Gertrude Janeček: Untersuchungen über chemischen Strahlenschutz an Pflanzenzellen	3. 5. 1960
Kelbitsch, Helga: Crown gall an viruskranken Pflanzen	6. 5. 1960
Moldenhauer Brooks, Matilda: Nicotine as a Redox-reducing Reagent Producing Abnormal Growth in Animal Cells	12. 5. 1960
Horle, K.: The Behavior of the Petals in the Fading of the Flowers of <i>Tradescantia reflexa</i>	14. 5. 1960
Olszewska, Maria J.: Recherches autoradiographiques sur la formation du phragmoplaste	23. 5. 1960
Olszewska, Maria J.: L'effet du β -mercaptoéthanol et de l'urée sur la structure du phragmoplaste	28. 5. 1960
Straus, W.: Studies on Chromoplasts of Carrot.	10. 6. 1960
Oppenheimer, H. R., und B. Jacoby: Usefulness of Autofluorescence Tests as Criterion of Life in Plant Tissues	17. 6. 1960
Arndt, E. A.: Professor Dr. Josef Spek 65 Jahre alt	24. 6. 1960
Werth, W.: Vergleichende Untersuchungen über die relative Permeabilität des Protoplasmas für Alkohol und Wasser	27. 6. 1960
Tazawa, M.: Weitere Untersuchungen zur Osmoregulation der <i>Nitella</i> -Zelle	28. 6. 1960
Reiter, L.: Viruskristalle in Nelken	7. 7. 1960
Ziegler, Annemarie: Spindelförmige Inthaltkörper in den Zellen von <i>Nitophyllum</i>	9. 7. 1960
Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien VII. Strukturaspekte der Grundsubstanz des Cytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel	12. 7. 1960
Käppner, W.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe <i>Chaos chaos</i> L. (II. Die Wirkung von Salyrgan, Cystein und ATP)	14. 7. 1960
Kinzel, H., und R. Imb: Über Vitalfärbung stark saurer Zellsäfte und eine Methode zur pH-Bestimmung in vivo	15. 7. 1960
Kenda, Griseldis: Einschlusskörper in den Epidermiszellen von <i>Chlorophytum comosum</i>	20. 7. 1960
Schneider, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (I. Die Frühwirkungen von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von <i>Paramecium</i>)	20. 8. 1960
Schneider, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (II. Die Spätwirkung von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von <i>Paramecium</i>)	20. 8. 1960
Sitte, P.: Zum Bau der Plastidenzentren in Wurzelproplastiden	23. 8. 1960
Parker, J., und D. E. Philpott: An Electron Microscopic Study of Chloroplast Condition in Summer and Winter in <i>Pinus strobus</i>	28. 8. 1960
Klima, J.: Elektronenmikroskopische Studien über die Feinstruktur der Trikladen (<i>Turbellaria</i>)	8. 9. 1960
Millčić, D., und Z. Udjinac: Virus-Eiweißspindeln der Kakteen in Lokalisationen von <i>Chenopodium</i>	15. 9. 1960

Fortsetzung auf der IV. Umschlagseite

Fortsetzung von der III. Umschlagseite

Klima, J., und R. Jarosch: Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper. II. (Elektronenmikroskopischer Befund)	20. 9. 1960
Bloching, A.: Die Wirkung cancerogener und östrogenen Stoffe auf Pflanzen	22. 9. 1960
Falke, D., und J.-E. Richter: Phasenkontrastmikroskopische Befunde zur Bildung mehrkerniger Kulturzellen.	8. 10. 1960
Kamiya, N.: Protoplasmaströmung	28. 10. 1960
Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien VIII. Zum Mechanismus der Cytoplasmaströmung in dünnen Fäden	31. 10. 1960

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von R. Doerr

Unter Mitwirkung von F. M. Burnet, Melbourne, M. D. Eaton, Boston, W. Henle, Philadelphia, C. W. Jungeblut, New York, P. Lépine, Paris, F. O. MacCallum, London, H. Ruska, Düsseldorf, R. N. Shope, New York, K. M. Smith, Cambridge, W. M. Stanley, Berkeley, J. D. Verlinde, Leiden

Herausgegeben von S. Gard, Stockholm, C. Hallauer, Bern, K. F. Meyer, San Francisco, E. G. Nauck, Hamburg, A. B. Sabin, Cincinnati

Schriftleitung: C. Hallauer, Bern

Zuletzt erschien:

Band X, Heft 3. (Abgeschlossen im August 1960.) Mit 22 Textabbildungen. 110 Seiten. 1960. S 162.—, DM 27.—, sfr. 27.60, \$ 6.45

Inhaltsverzeichnis: Traub, E. Demonstration, Properties and Significance of Neutralizing Antibodies in Mature Mice Immune to Lymphocytic Choriomeningitis (LCM). — Traub, E. Observations on Immunological Tolerance and „Immunity“ in Mice Infected Congenitally with the Virus of Lymphocytic Choriomeningitis (LCM). — Dubes, G. R., Margaret Chaplin, and Otis Tolbert. The Genetic Relationship Between Thermostability of Poliovirus and Its in vivo Response to Cystine. — Paccaud, M. F., E. Pongrats et J. Schlaepfer. La micro-réaction de floculation sur lame par la technique de double diffusion en agar entre anticorps et antigènes poliomyéliques I. — Paccaud, M. F., E. Pongrats et J. Schlaepfer. La micro-réaction de floculation sur lame par la technique de double diffusion en agar entre anticorps et antigènes poliomyéliques II. — Schmidt, B., D. Hartmann und K. Großgebauer. Die Gewinnung unterschiedlicher Hämagglutininfraktionen aus Influenzaviren mit Hilfe von DEAE-Zellulose-Ionenaustauscher. — Stigurdsson, B., H. Thormar, and P. A. Pálsson. Cultivation of Viena Virus in Tissue Culture. — Beunders, B. J. W., J. H. Driessen, and C. van den Hoek. Clinical Picture and Serological Response to Vaccination with Formalinized Vaccinia Virus Followed by Scarification with Active Vaccine, in Military Personnel. — Govaerts, A. Infectious Canine Hepatitis and Human Hepatitis.

Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von Lothar Geitler, Wien

Zuletzt erschien:

Band 107, Heft 5 (Schlußheft). (Ausgegeben im Dezember 1960.) Mit 13 Textabbildungen. 47 Seiten. 1960. S 90.—, DM 16.50, sfr. 16.90, \$ 3.95

Inhaltsverzeichnis: Abhandlungen: Leinfellner, W. Zur Kenntnis des Monokotyledonen-Perigons. I. Die Perigonblätter von *Dipidax*. — Fetzmann, Eisaloro. Zum Vorkommen von *Endoderma perforans* HUBER im Salz-lachengebiet am Neusiedler See. — Thaler, Irntraud, und F. Weber. Frühblühende *Aesculus*-Bäume. — Reehinger, K. H. Zwei neue Arten der Gattung *Anchusa* aus Griechenland. — Leinfellner, W. Zur Kenntnis des Monokotyledonen-Perigons. II. Die Perigonblätter von *Ornithoglossum*. — Besprechungen.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

